



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UDELAR | fcien.edu.uy



PEDECIBA



AGENCIA NACIONAL  
DE INVESTIGACIÓN  
E INNOVACIÓN

# Doppler ultrarrápido y ultrasonido funcional para cuantificación de volumen sanguíneo y estudio de conectividad cerebral en ratones Trembler-J, modelo de la neuropatía Charcot-Marie-Tooth-1E

Maximiliano Anzibar Fialho

Programa de Posgrado en Física  
Facultad de Ciencias  
Universidad de la República

Montevideo – Uruguay  
Junio de 2023



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)



PEDECIBA



AGENCIA NACIONAL  
DE INVESTIGACIÓN  
E INNOVACIÓN

# Doppler ultrarrápido y ultrasonido funcional para cuantificación de volumen sanguíneo y estudio de conectividad cerebral en ratones Trembler-J, modelo de la neuropatía Charcot-Marie-Tooth-1E

Maximiliano Anzibar Fialho

Tesis de Maestría presentada al Programa de Posgrado en Física, Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Magíster en Física.

Directores:

Dr. Javier Brum

Dr. Nicolás Rubido

Dra. Alejandra Kun

Montevideo – Uruguay

Junio de 2023

Anzibar Fialho, Maximiliano

Doppler ultrarrápido y ultrasonido funcional para cuantificación de volumen sanguíneo y estudio de conectividad cerebral en ratones Trembler-J, modelo de la neuropatía Charcot-Marie-Tooth-1E / Maximiliano Anzibar Fialho. - Montevideo: Universidad de la República, Facultad de Ciencias, 2023.

XIII, 106 p. 29, 7cm.

Directores:

Javier Brum

Nicolás Rubido

Alejandra Kun

Tesis de Maestría – Universidad de la República, Programa en Física, 2023.

Referencias bibliográficas: p. 80 – 89.

1. Imagenología, 2. Doppler Ultrasónico, 3. Redes funcionales del cerebro, 4. Neurodegeneración, 5. Trembler-J. I. Brum, Javier, Rubido, Nicolás, Kun, Alejandra, . II. Universidad de la República, Programa de Posgrado en Física. III. Título.

INTEGRANTES DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

---

Ph.D. Arturo Martí

---

Ph.D. Daniel Ariosa

---

Ph.D. Pablo Torterolo

---

Ph.D. Jerome Baranger

---

Ph.D. Javier Brum

Montevideo – Uruguay  
Junio de 2023

Dedicada a Dorys.

# Agradecimientos

Quisiera agradecer a Javier, Nicolás y Alejandra por el constante trabajo y disponibilidad durante todo el proceso, las enseñanzas a nivel profesional y personal, y la incansable voluntad de empujar un poquito más para obtener lo mejor de la investigación, lo que denota su gran calidad y capacidad como científicos y científica.

Un especial agradecimiento a Mariana, extraordinaria compañera de trabajo durante todos estos años de posgrado y sin la cual ninguno de estos resultados serían posibles. También a Lucía y Juan Pablo, quienes enriquecieron enormemente este trabajo con sus aportes, y fueron personas imprescindibles para varios de los conocimientos adquiridos durante esta tesis. A Carlos, por las gestiones académicas, por su inagotable voluntad de formar un grupo interdisciplinario de trabajo y su constante visión a futuro.

Agradecer al tribunal de tesis por aceptar la invitación y leer el manuscrito. A Jimena por su implacable gestión, su amabilidad y cariño durante estos años en el programa de PEDECIBA.

A la ANII. por el apoyo tanto de mi beca de Maestría como por la financiación del proyecto FCE\_1\_2019\_1\_155539 sin el cual no hubiese sido posible la implementación de las técnicas experimentales de este trabajo. Al LIA IFUP (Instituto Franco-Uruguayo de Física) por permitir la colaboración internacional.

Por último pero no menos, a todas las amistades que me han dejado estos años de estudio en la facultad, sin las cuales el destino como estudiante hubiese sido otro, pero más importante aún, la vida sería más aburrida. A Felipe, Cami, Quiti, Sofi, Tom, Vale, Joaco, Nacho, Nico, Fefy, Juan, Juanpe, Renzo, Nica, Yamil, Mateo y Gonza.

Por su apoyo incondicional y cariño, a mi familia, a mis amigxs de toda la vida y a Alma.

*En el comienzo éramos todas y todos el mismo viviente. Hemos compartido el mismo cuerpo y la misma experiencia. Las cosas no han cambiado tanto desde entonces. Hemos multiplicado las formas y las maneras de existir, pero todavía hoy somos la misma vida.*

Emanuele Coccia

## RESUMEN

Las técnicas de imagenología han resultado fundamentales para comprender los procesos funcionales y la compleja dinámica cerebral. La imagenología por ultrasonido Doppler Ultrarrápido ha demostrado ser una potente herramienta para analizar la neurovasculatura, al permitir medir los cambios en volumen sanguíneo relacionados a la actividad neuronal. Esta técnica, aplicada a evaluar las variaciones temporales del volumen sanguíneo en regiones cerebrales se denomina Ultrasonido Funcional (fUS). El fUS permite caracterizar la dinámica neurovascular asociada a funciones específicas del cerebro, como lo son la respuesta a un estímulo sensorial y los procesos intrínsecos que se generan en la ausencia de estímulos externos. En esta tesis, utilizamos fUS para realizar una novedosa caracterización de la respuesta neurovascular a un estímulo y estudiar la conectividad cerebral para ratones WildType (WT), considerados sanos y usados como control, y ratones Trembler-J (TrJ), modelo asociado a la neuropatía Charcot-Marie-Tooth-1E (CMT-1E). En particular, utilizamos fUS para construir y analizar las redes funcionales del cerebro (RFC) de los ratones WT y TrJ en dos estados: de reposo, correspondiente al animal sedado sin estímulo externo específico, y bajo estímulo, donde el animal recibe un patrón periódico de estimulación sensorial por medio de la vía de los bigotes. Pudimos comprobar que en el modelo TrJ la respuesta cerebral bajo estímulo se manifiesta de forma diferente que en el modelo WT de ratón sano, lo que sugiere una afección de la vía sensorial a causa de la enfermedad. También encontramos un comportamiento diferencial en las RFC de ambos modelos murinos a nivel del sistema nervioso central y periférico. Ambos hallazgos resultan particularmente relevantes ya que la neuropatía CMT-1E es considerada una afección exclusivamente periférica. Por lo tanto, el trabajo de esta tesis representa un aporte interdisciplinario, original y valioso, que abre nuevas perspectivas para la comprensión de los mecanismos subyacentes en el fenotipo clínico TrJ. Además, representa el primer desarrollo de la técnica de fUS a nivel nacional y regional, abriendo nuevas posibilidades de colaboración interdisciplinaria en estudios neurológicos.

Palabras claves:

Imagenología, Doppler Ultrasonido, Redes funcionales del cerebro, Neurodegeneración, Trembler-J.

## ABSTRACT

Imaging techniques have been essential to understand the brain's complex dynamics and functional processes. In particular, Ultrafast Ultrasound Doppler imaging has proven to be a powerful tool to analyze the neurovasculature, given that it can measure changes in the cerebral blood volume (CBV) due to neuronal activity. This technique applied to study the temporal variations of the CBV in specific brain regions is known as functional Ultrasound (fUS). The fUS allows to characterize the neurovascular dynamics associated with specific functions of the brain, such as the response to a sensory stimulus or mind wandering that emerges in the absence of external stimulation. In this thesis, we use fUS to study the functional connectivity of WildType (WT) mice, which constitute a healthy animal model that we use as control group, and Trembler-J (TrJ) mice, a model for the Charcot-Marie-Tooth-1E (CMT-1E) neuropathy. Specifically, we construct and analyze brain functional networks (BFN) in WT and TrJ mice during two functional states: resting state, which corresponds to the sedated animal without specific external stimulus, and under stimulation, which corresponds to applying a periodic stimulation pattern to the mice's whiskers. We show that in TrJ mice, the brain response to the stimulus is different than in WT mice, which suggests an alteration in the whisker sensory path due to the CMT-1E disease. We also find differences between the BFN of both animal models in the central and peripheral nervous system. These findings are significant, since the CMT-1E has been exclusively described as a peripheral disease. Overall, this work is an original, interdisciplinary, and valuable contribution, presenting new ways to understand the underlying mechanisms of the clinic TrJ phenotype. Moreover, this is the first local and regional work implementing fUS and using it for neurological studies, paving the way for the creation of new interdisciplinary collaborations.

Keywords:

Imaging techniques, Ultrasonic Doppler, Functional brain networks, Neurodegeneration, Trembler-J.

# Tabla de contenidos

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
1.1	Reseña histórica: ultrasonido para evaluar el flujo neurovascular . . .	1
1.2	Ultrasonido funcional aplicado al campo de la neurociencia . . . . .	5
1.3	Conectividad cerebral y posibilidades del Ultrasonido funcional . . .	8
1.4	Ultrasonido funcional como herramienta para estudiar enfermeda- des neurodegenerativas . . . . .	10
1.5	Objetivos y estructura de la tesis . . . . .	11
<b>2</b>	<b>Imagenología Doppler Ultrarrápida y Ultrasonido Funcional</b>	<b>14</b>
2.1	Efecto Doppler y Power Doppler . . . . .	15
2.2	Imagenología Ultrarrápida . . . . .	21
2.3	Doppler Ultrarrápido y Ultrasonido Funcional . . . . .	24
<b>3</b>	<b>Dispositivo experimental</b>	<b>28</b>
3.1	Secuencia de adquisición de imágenes . . . . .	28
3.2	Filtro espacio-temporal para imágenes Doppler . . . . .	30
3.3	Modelos animales utilizados . . . . .	34
<b>4</b>	<b>Estudio combinado entre imagenología Doppler Ultrarrápida y Micros- copía Confocal</b>	<b>37</b>
4.1	Adquisición y procesamiento de imágenes Doppler Ultrarrápidas . . .	38
4.2	Adquisición y procesamiento de imágenes por Microscopía confocal	42
4.3	Análisis estadístico . . . . .	43
4.4	Resultados y discusión . . . . .	44
<b>5</b>	<b>Determinación de redes cerebrales mediante ultrasonido funcional: aplicación a la enfermedad neurodegenerativa Charcot-Marie-Tooth</b>	<b>50</b>
5.1	Materiales y métodos empleados en Ultrasonido Funcional . . . . .	52

5.1.1	Procedimiento experimental animal . . . . .	52
5.1.2	Adquisición y filtrado de imágenes . . . . .	52
5.1.3	Vía de las vibrisas en ratones . . . . .	53
5.1.4	Procesamiento y seccionamiento de la imagen . . . . .	54
5.1.5	Mapas de activación . . . . .	56
5.1.6	Análisis de la región S1BF . . . . .	58
5.1.7	Análisis de las redes funcionales del cerebro . . . . .	60
5.1.8	Análisis estadístico . . . . .	60
5.2	Resultados y discusión . . . . .	62
5.2.1	Estudio de la región S1BF . . . . .	62
5.2.2	Redes funcionales del cerebro . . . . .	65
<b>6</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>73</b>
6.1	Puesta a punto de la técnica y análisis de la sensibilidad del Doppler Ultrarrápido . . . . .	74
6.2	Ultrasonido funcional para analizar el modelo de neurodegeneración de la enfermedad Charcot-Marie-Tooth . . . . .	74
<b>7</b>	<b>Consideraciones generales y perspectivas a futuro</b>	<b>76</b>
7.1	Trabajos futuros con fUS aplicado a estudiar la neuropatía Charcot-Marie-Tooth . . . . .	76
7.2	Análisis adicionales para estudiar las redes del cerebro . . . . .	77
7.3	Mejoras y nuevas posibilidades de implementar la caracterización del flujo con imagenología Doppler Ultrarrápida . . . . .	78
	<b>Referencias bibliográficas</b>	<b>80</b>
	<b>Anexos</b>	<b>90</b>
	Anexo 1 Fundamento teórico de la descomposición en valores singulares de una matriz . . . . .	91
1.1	Otros estimadores para el filtro de imágenes por descomposición en valores singulares . . . . .	92
1.1.1	Estimador basado en los valores singulares . . . . .	92
1.1.2	Estimador basado en los vectores singulares temporales $V$ . . . . .	93
	Anexo 2 Métodos estadísticos . . . . .	96
2.1	Test Shapiro-Wilk . . . . .	96
2.2	Test t-Student . . . . .	97

2.3	Test Mann-Whitney . . . . .	98
2.4	Test ANOVA . . . . .	99
Anexo 3	Resultados adicionales del ultrasonido funcional . . . . .	100
Anexo 4	Publicaciones y presentaciones en congresos derivados de la tesis . . . . .	104

# Capítulo 1

## Introducción

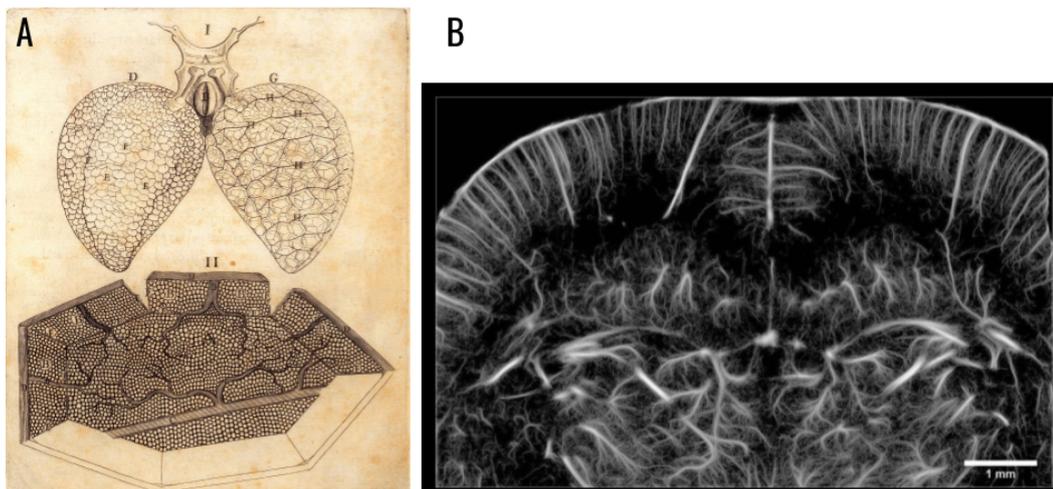
Este trabajo de tesis propone explorar la utilización de ultrasonido para estudiar la hemodinámica cerebral en pequeños animales y desarrollar una metodología que permita analizar distintas configuraciones neurológicas propias del animal. En este capítulo se dará una breve revisión histórica de la relevancia del ultrasonido empleado a estudios médicos y biológicos, y se pondrá en contexto el desarrollo actual de dicha aplicación para estudios neurológicos. Finalmente, se resumen los objetivos planteados y el alcance del trabajo.

### **1.1. Reseña histórica: ultrasonido para evaluar el flujo neurovascular**

Comenzemos con un poco de historia, en 1661 donde, unos 50 años después de la invención de los primeros microscopios (Croft, 2006), el profesor de anatomía italiano Marcello Malpighi lograba observar y confirmar la existencia de los capilares (Pearce, 2007). Estas estructuras vasculares se habían comenzado a describir unos 100 años antes con los trabajos pioneros de Leonardo da Vinci que revolucionaron la forma de entender el aparato circulatorio (Sterpetti, 2019). En ellos, da Vinci cambió el paradigma al entender que el corazón sirve de bomba para distribuir la sangre hacia los tejidos, sirviéndose de arterias que se ramifican en estructuras cada vez más pequeñas. Pero fue realmente Malpighi quien en su trabajo seminal *De Pulmonibus observations anatomicae*, donde estudiaba el concepto de oxigenación venosa en los pulmones, logró comprender el funcionamiento y relevancia de los capilares. Al día de hoy entendemos que estas estructuras, las más pequeñas del sistema circulatorio (entre 5 y 10 micrómetros de diámetro), sirven de puente entre

arteriolas y vénulas, es decir, entre la sangre que fluye del corazón al resto del cuerpo y que luego retorna hacia él. Por lo tanto, son la base del intercambio sanguíneo con el medio extra celular, permitiendo la distribución de oxígeno y componentes esenciales para la vida de la células.

El avance tecnológico ha permitido que dispongamos en la actualidad de diversas técnicas para observar el sistema circulatorio a estas escalas, sin embargo, muchas de ellas requieren de una observación post mortem, generalmente a través de un microscopio. Aquí entra el ultrasonido, que ha sido por excelencia la técnica utilizada para observar y medir el movimiento de la sangre en grandes vasos dentro del cuerpo, pero que actualmente ha logrado posicionarse también como una técnica de excepcional capacidad para estudiar el comportamiento del flujo sanguíneo a nivel micro vascular (Demeulenaere et al. 2022)(Renaudin et al. 2022)(Errico et al. 2015). La figura 1.1 condensa un viaje temporal de 350 años en el desarrollo de las técnicas que permiten observar el sistema vascular dentro del cuerpo. El panel A muestra un esquema original realizado por Malphigi para comprender la vasculatura a nivel pulmonar, y la función esencial de los capilares. En el panel B se muestra una imagen de la vasculatura en el cerebro de una rata, adquirida con técnicas de ultrasonido, donde se observa la gran capacidad de resolución espacial que permite un análisis a nivel capilar.



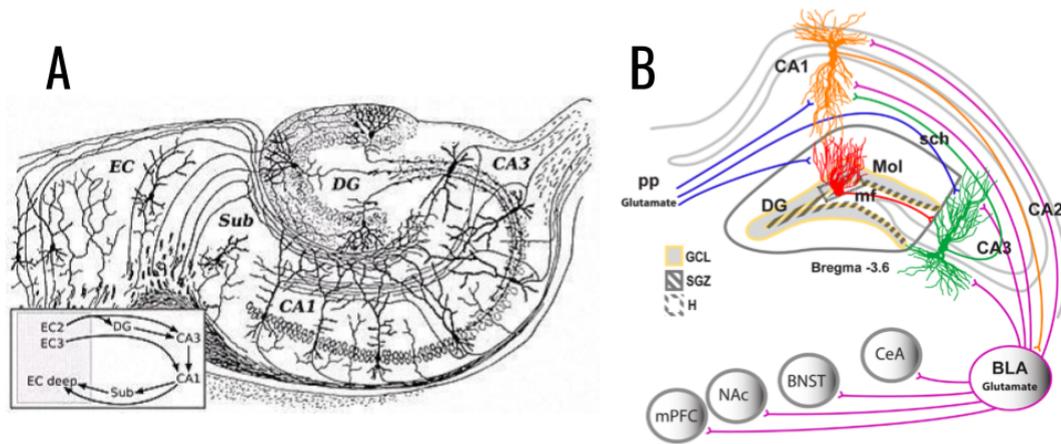
**Figura 1.1:** (A) Imagen extraída de (Young, 1929) donde se muestran los esquemas originales de Malphigi para entender la vasculatura pulmonar y la relevancia de los capilares en los procesos de oxigenación celular. (B) Imagen tomada de (Hingot et al. 2019) mostrando el estado del arte de la imagenología por ultrasonido de la vasculatura cerebral.

La segunda coyuntura histórica para introducirnos aún más en la temática la po-

demos situar a comienzos del siglo pasado, cuando el investigador español Santiago Ramón y Cajal cambiaba el paradigma de nuestro entendimiento del sistema nervioso con su *doctrina de la neurona* (De Castro y Merchan, 2016). En esta teoría Ramón y Cajal sitúa a la neurona como el elemento constitutivo del sistema nervioso central, siendo la unidad funcional y anatómica de una compleja red de conexiones celulares. Basándose en las técnicas de tinción desarrolladas por Golgi (Bentivoglio et al. 2019), que permitieron entender la estructura fina del sistema nervioso, Ramón y Cajal logró, a través de evidencia experimental y esquemas dibujados a mano, dar una comprensión de la funcionalidad y conectividad de las distintas estructuras anatómicas (Cajal, 1911). En dicho artículo, Ramón y Cajal describe las principales conexiones del hipocampo (Figura 1.2A), una estructura central en los procesos de memoria y aprendizaje que tendrá gran relevancia para este trabajo de tesis. Lo asombroso del trabajo de Ramón y Cajal fue su capacidad para entender la dinámica de las estructuras nerviosas sin contar con herramientas que le permitieran medir y observar la variabilidad temporal, sino únicamente a partir de imágenes anatómicas. Muchas de las técnicas modernas permiten estudiar al sistema nervioso de forma dinámica. Desde reconstrucciones en tres dimensiones de la conectividad cerebral en humanos (Cox y Jesmanowicz, 1999)(Hearne et al. 2016), hasta medir la actividad eléctrica de neuronas aisladas (Goldring y Ratcheson, 1972), todo un espectro de técnicas se despliegan entre medio.

En la figura 1.2A se muestra el esquema original de Ramón y Cajal para entender la conectividad a nivel del hipocampo. Varias décadas después, con el desarrollo de la tecnología, diversos estudios lograron confirmar los resultados propuestos por Ramón y Cajal, realizando de esta manera su extraordinaria capacidad para inferir procesos dinámicos, como por ejemplo, la dirección de los impulsos nerviosos, únicamente a partir de datos de la estructura neuronal. En el panel B de la figura 1.2 se muestra un esquema de la organización neuronal del hipocampo y cómo las subregiones se conectan a través de distintos tipos de neuronas para formar los circuitos funcionales del hipocampo (extraído de Mandyam, 2013). En este trabajo se discute la relación entre el sistema de estrés de la amígdala con la neuroplasticidad del hipocampo, evaluando la formación de circuitos de memoria en esta estructura.

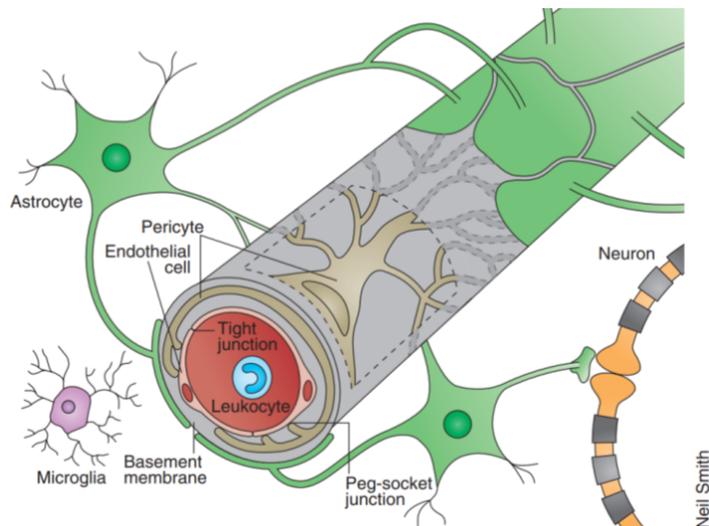
La imagenología del cerebro por ultrasonido se halla en la intersección de los campos de investigación de Malphigi y Ramón y Cajal, ya que su base se encuentra en lo que llamamos el *acoplamiento neurovascular* (Iadecola, 2017). Esto es la relación que hay entre la actividad neuronal eléctrica y la perfusión sanguínea de los tejidos nerviosos. La *barrera hematoencefálica* es un endotelio altamente especia-



**Figura 1.2:** (A) Esquema realizado en 1911 por Ramón y Cajal para entender la conectividad del hipocampo. (B) Extraído de Mandyam, 2013. Esquema representativo de los circuitos neuronales presentes en el hipocampo. Se muestran las subregiones de esta estructura y cómo se conectan mediante distintos tipos de neuronas, lo que permite explicar las bases funcionales de dicha estructura.

lizado que permite el intercambio de sustancias como oxígeno, agua, nutrientes o distintos componentes químicos, entre el sistema vascular y el sistema nervioso. Este traspaso se da a partir de la interacción de distintos componentes neurovasculares como astrocitos, neuronas, microglías, perocitos o células vasculares, que dan lugar a la denominada *unidad neurovascular* (como se ve en la figura 1.3). Esta unidad funcional es la base de la relación entre la actividad neuronal y el flujo vascular. Esto permite que distintas técnicas de imagenología, como la resonancia magnética (a través de medir la oxigenación de la neurovasculatura) o el ultrasonido (al medir el flujo sanguíneo) puedan obtener información del comportamiento neurológico estudiando el componente vascular.

Este acoplamiento resulta fisiológicamente tan fundamental que un mal funcionamiento tiene implicancias directas en el desarrollo de importantes enfermedades neurológicas (Zlokovic, 2008) (Girouard y Iadecola, 2006). Por ejemplo, en el trabajo de Nunez-Elizalde et al. 2022 se analiza la relación directa entre la señal eléctrica proveniente de las neuronas y la respuesta hemodinámica obtenida con ultrasonido. El complejo proceso de intercambio elemental resta aún por comprenderse en su totalidad, sin embargo, el ultrasonido ha permitido profundizar en el entendimiento de esta unidad funcional.



**Figura 1.3:** Esquema de la unidad neurovascular adaptado de Obermeier et al. 2013. En el se muestra la interacción de los componentes del sistema nervioso, como las neuronas, astricitos y microglías, con los componentes del sistema vascular para formar el acomplamiento neurovascular. A partir de esta unidad funcional se da el intercambio de sustancias vitales para el correcto funcionamiento de la neurona y la posterior actividad sináptica.

## 1.2. Ultrasonido funcional aplicado al campo de la neurociencia

La implementación de técnicas de ultrasonido en el campo de la neurociencia parece ir allanando de forma prometedora el camino hacia un entendimiento más profundo del sistema nervioso. Más específicamente, en los últimos años se ha desarrollado la técnica de *ultrasonido funcional* (o fUS por sus siglas en ingles: "functional Ultrasound"). Esta técnica es una combinación de métodos tradicionales de observación del flujo con ultrasonido, lo que se conoce como Power Doppler, y el reciente desarrollo de la imagenología ultrarrápida por ultrasonido. Consiste en adquirir un gran número de imágenes Doppler (es decir del flujo sanguíneo) a alta cadencia, que luego se promedian y generan una única imagen de mayor sensibilidad que las individuales. Esta imagen mide el volumen de sangre en el cerebro (o "cerebral blood volume", CBV), que se relaciona directamente con la cantidad de glóbulos rojos presentes en cada vaso. Como se mencionó anteriormente, el acomplamiento neurovascular posibilita la asociación directa entre esta medida vascular con la actividad neuronal de la región comprometida. El incremento de sensibilidad logrado permite detectar el cambio en el CBV de pequeños vasos, y la posibilidad de obtener imágenes sucesivas del flujo permite estudiar de forma dinámica la

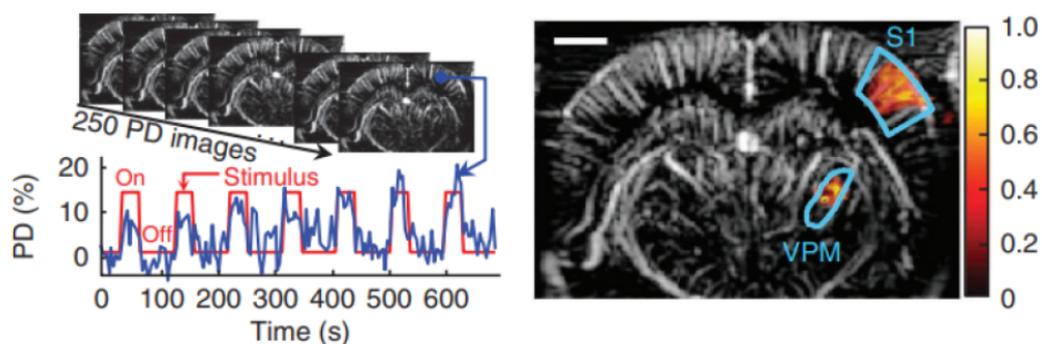
respuesta cerebral frente a un estímulo sensorial específico.

El creciente éxito del ultrasonido funcional aplicado al cerebro se debe a la posibilidad de integrar un conjunto de cualidades importantes al momento de elegir una técnica de imagenología. Podemos considerar 3 características principales que son: la resolución espacio-temporal, la profundidad de observación y la versatilidad, entendiendo esto último como la combinación de portabilidad, costo y diversidad de sensores. En primer lugar el fUS combina una buena resolución temporal ( $\approx 1$  segundo) y espacial ( $\approx 0.1\text{mm}$ ) para observar la dinámica cerebral (Mace et al. 2013). Otros métodos de gran precisión espacial como la tomografía por emisión de positrones no permiten una buena resolución temporal en los datos ( $\approx 10$  segundos), mientras que el uso de electrodos para el registro de la actividad eléctrica permite una excelente resolución temporal pero muy baja resolución espacial (en el orden de varios centímetros). Por otro lado, las técnicas ópticas permiten una buena resolución espacial y temporal a la vez ( $\approx 10\mu\text{m}$ ,  $\approx 10\mu\text{s}$ ), sin embargo no tienen una buena capacidad de penetración, por lo que a nivel del cerebro solo se limitan a estudiar la corteza. El ultrasonido funcional es capaz de obtener imágenes de estructuras que se encuentran varios centímetros por debajo del cráneo (Mace et al. 2013). Esto va a depender del tipo de ondas que se estén utilizando, pero incluso para altas frecuencias (30MHz) se logra una profundidad de penetración de  $1\text{cm}$ , suficiente para observar el cerebro completo de un ratón (Koekkoek et al. 2018).

Por último, la técnica de resonancia magnética funcional (fMRI) ha sido la más utilizada para estudiar la dinámica cerebral, al combinar una gran capacidad de obtener imágenes a distintas profundidades junto a una muy buena resolución espacio-temporal (tamaño de píxel cúbico de  $\approx 1\text{mm}$  y  $\approx 3\text{s}$  para muestrear todo el cerebro). Sin embargo, el ultrasonido funcional representa una gran ventaja en cuanto a costo, portabilidad y versatilidad. Mientras que en fMRI los equipos ocupan grandes espacios dentro de una sala, son pesados y difíciles de transportar, así como de difícil adquisición para uso exclusivamente científico, el ultrasonido se presenta como una alternativa sumamente portable y económica (Wang et al. 2020). Además, presenta la ventaja de poder utilizar sondas intercambiables para realizar distintos tipos de análisis utilizando el mismo ecógrafo. Otra de las ventajas es su aplicación a estudiar neonatos, donde el uso de fMRI implica una sedación del individuo no deseada a edades tempranas. De la misma forma, gracias a su reducido tamaño y portabilidad permite la investigación en pequeños animales los cuales no pueden ser introducidos en campos magnéticos de gran magnitud como los presentes en fMRI (Mace et al. 2013). De esta forma el fUS, se posiciona como una herramienta

prometedora para la investigación neurológica.

En este sentido, el trabajo pionero de (Mace et al. 2011) abrió las puertas al desarrollo de esta técnica aplicada a entender la dinámica cerebral. En dicho trabajo se analiza la respuesta neurovascular al aplicar un estímulo específico en ratas, en este caso el movimiento de las vibrisas. Como se muestra en la figura 1.4 se aplica un patrón de estímulo externo y se evalúa qué región del cerebro se activa de forma correlacionada con dicho estímulo. Esto permite analizar las regiones comprometidas con una función sensorial específica. También demuestra las ventajas de la buena resolución temporal al lograr analizar un episodio epiléptico cerebral, lo cual es sumamente complejo con otras técnicas como resonancia magnética funcional (Mace et al. 2013). La metodología desarrollada en este trabajo servirá de base para los estudios de fUS posteriores, y demuestra la capacidad del ultrasonido funcional para analizar la respuesta neurológica.



**Figura 1.4:** Adaptado de (Mace et al. 2011). En el panel de la izquierda se muestra la señal Doppler obtenida con ultrasonido, superpuesta al estímulo generado, indicando la concordancia entre ambas en la escala temporal. En el panel de la derecha se muestra la activación de la corteza somatosensorial primaria (S1) y el núcleo ventral posterior medial (VPM) al estimular las vibrisas de un ratón.

Durante la última década el fUS ha logrado importantes avances a nivel técnico (referente a la metodología de adquisición y procesamiento de imágenes) y tecnológico (relacionado al desarrollo de nuevos ecógrafos con mayor capacidad de procesamiento y una variedad de sondas en 2 y 3 dimensiones). En cuanto a la resolución espacial, la utilización de agentes de contraste permite observar la dinámica sanguínea en vasos microscópicos. En el trabajo de Errico et al. 2015 se inyectan microburbujas al torrente sanguíneo lo cual permite obtener, por primera vez utilizando ultrasonido, imágenes transcraniales del flujo a una escala de micrómetros. Posteriormente el trabajo de Renaudin et al. 2022 demuestra la posibilidad de realizar un análisis funcional a partir de estas imágenes de resolución micrométrica.

En él se cuantifica la hiperemia cerebral en una región activada con una resolución temporal de 1 segundo.

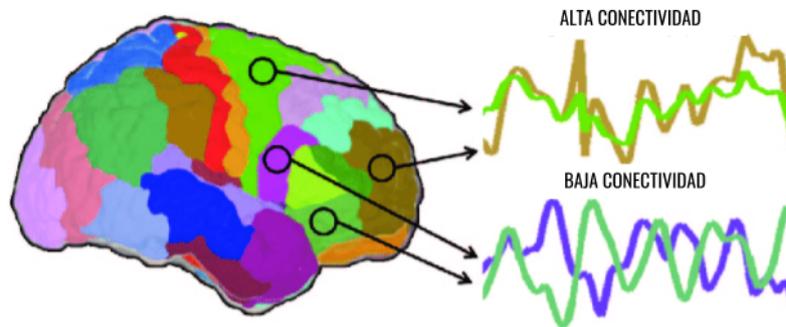
Paralelamente, el desarrollo de nuevas sondas de ultrasonido ha permitido el estudio funcional del cerebro en 3 dimensiones. En el trabajo de (Rabut et al. 2019) se demuestra la capacidad de obtener información espacio temporal del flujo sanguíneo en un volumen del cerebro, y no solamente en un plano. Estudian la respuesta a diversos estímulos sensoriales y la conectividad entre distintas partes del cerebro.

Por último, también se ha logrado aplicar el fUS mientras el animal se encuentra en libre movimiento (Tiran et al. 2017). Esto representa una absoluta ventaja de portabilidad frente a otras técnicas y posibilita a estudios combinados de registro neurovascular y comportamiento de forma simultánea.

### **1.3. Conectividad cerebral y posibilidades del Ultrasonido funcional**

Uno de los enfoques más utilizados a la hora de entender el funcionamiento del cerebro refiere a estudiar la conectividad del mismo. Por conectividad entendemos la interacción de distintas partes del cerebro, definidas a partir de una referencia anatómica y estudiadas bajo un estado funcional específico. El objetivo es comprender los patrones espacio-temporales de actividad intrínseca del cerebro, mientras este se encuentra en un estado fisiológico determinado, el cual puede ser cumpliendo una tarea específica o en reposo.

Una análisis de conectividad comprende varias etapas de post procesamiento de los datos obtenidos a partir de imagenología. En primer lugar definir las regiones de interés (que pueden ser en 2 o 3 dimensiones dependiendo la técnica) que son relevantes para el estudio en particular. Para ello se utilizan referencias anatómicas denominados Atlas del cerebro. Por ejemplo, en el caso de ratones, el Atlas Paxinos y Franklin, 2019 exhibe cortes coronales y sagitales del cerebro, delimitando en cada uno de ellos las regiones anatómicas presentes. Luego, esta anatomía debe ser trasladada a las imágenes del cerebro obtenidas por imagenología (fUS, fMRI, etc), que es donde se encuentra la información espacio-temporal del funcionamiento neurológico. De esta forma se enlaza la funcionalidad con la anatomía cerebral. Los siguientes pasos consisten en relacionar la señal temporal de las distintas regiones de interés para formar lo que se conoce como *redes del cerebro*. Esto corresponde a crear una red, o grafo, donde cada nodo sea una región de interés y analizar las



**Figura 1.5:** Adaptado de Scheinost et al. 2017. Se muestra una representación característica para analizar las redes funcionales del cerebro. Distintas regiones anatómicas del cerebro se representan a través de distintos colores que permiten identificar su extensión espacial. Luego se correlacionan las señales temporales representativas de cada región para evaluar la conectividad entre ellas.

conexiones entre cada uno de ellos. En la figura 1.5 se observa un esquema adaptado de Scheinost et al. 2017, donde se muestra la representación típica para analizar la conectividad cerebral. En dicho trabajo se definen redes del cerebro para estudiar la influencia del estrés prenatal en la conectividad. Distintas regiones anatómicas del cerebro se representan a través de distintos colores que permiten identificar su extensión espacial. Luego, a cada una de estas regiones se asigna una señal temporal representativa, la cual se puede correlacionar con la señal análoga de otra región. Así, dos señales con comportamientos similares representan una alta conectividad entre dichas regiones, mientras que señales no coincidentes representan una baja conexión.

A pesar del notable incremento en la utilización del fUS para estudiar el cerebro, son escasos y muy recientes los trabajos donde se analiza la conectividad cerebral en ratones u otros pequeños animales. Esto refiere a la relación funcional entre distintas partes del cerebro, y cómo esta asociación varía en el tiempo. En el caso de Ferrier et al. 2020 se analiza la respuesta a un estímulo y la conectividad para distintos niveles de anestesia en ratones. Posteriormente, se compara la conectividad mientras el ratón está siendo estimulado y cuando no lo está, con el objetivo de estudiar la estructura de una posible red por defecto (Default Mode Network). Este tipo de redes ampliamente estudiadas en humanos comprende un conjunto de asociaciones funcionales cuando el individuo no está recibiendo un estímulo o tarea específica, simplemente pensando de forma pasiva el entorno. De dicho trabajo se desprende la hipótesis de existencia de una posible red por defecto análoga en ratones.

Por otro lado, en Bertolo et al. 2021 se estudia la conectividad y emergencia de

redes del cerebro de ratones utilizando fUS en 3 dimensiones. Se logra obtener imágenes del cerebro completo y comparar la respuesta al estímulo cuando el animal está anestesiado y cuando está despierto. Finalmente en el trabajo de Baranger et al. [2021](#) se aplica fUS para analizar la conectividad en neonatos. En dicho trabajo se demuestra la conectividad interhemisférica en el cerebro de recién nacidos y se estudian las diferencias en la red talamo-cortical para bebés prematuros.

## **1.4. Ultrasonido funcional como herramienta para estudiar enfermedades neurodegenerativas**

Entender el funcionamiento dinámico del cerebro no solamente aporta a una comprensión fundamental de los mecanismos neurológicos sino también a la posibilidad de diagnósticos y análisis clínicos de enfermedades. En los últimos años se ha logrado aplicar satisfactoriamente ultrasonido funcional para evaluar alteraciones vasculares en alguna de las principales enfermedades neurodegenerativas. En el reciente trabajo de Morisset et al. [2022](#) utilizan fUS para estudiar la dinámica vascular de la retina en un modelo de demencia en ratas. Se demuestra la capacidad del fUS para reportar cambios en la respuesta hemodinámica entre ratones sanos y enfermos, permitiendo así una temprana detección de alteraciones debidas a la enfermedad. Como segundo ejemplo, el trabajo de Rytönen et al. [2020](#) reporta variaciones en la respuesta vascular medidas con fUS para ratones que modelan la enfermedad de Alzheimer, acompañados además de efectos de neuroinflamación y afección de la densidad sináptica. De esta forma el fUS se posiciona como una potente herramienta para el análisis y diagnóstico de afecciones neurodegenerativas.

En particular, la enfermedad llamada Charcot-Marie-Tooth (CMT) es el desorden neuromuscular hereditario más común en humanos, con una prevalencia de 1 en 2500 (Pareyson y Marchesi, [2009](#))(Reilly et al. [2011](#)). Los síntomas se presentan en humanos como pérdida y debilitamiento muscular, comenzando por típicos arqueamientos de pies y dedos del pie, continuando con una degeneración completa de los miembros inferiores, y en estados más avanzados con la atrofia de manos y miembros superiores. CMT está precisamente caracterizada a nivel molecular lo que permite diagnósticos certeros, pero aun no existe un tratamiento farmacéutico efectivo para su reversión y el tratamiento se restringe a la rehabilitación muscular o cirurgías como método paliativo de las deformaciones.

La causa de CMT reside en la mutación de ciertos genes que codifican proteínas

asociadas a procesos de mielinización y formación cito esquelética en las células de Schwann (Kun, Rosso et al. 2012). Estas células son las glías presentes en el sistema nervioso periférico y su función es la de efectivizar el proceso de transmisión del impulso nervioso a través del axón. Por lo tanto, se puede considerar a la enfermedad de CMT como una afección nerviosa periférica.

Entender los mecanismos neurológicos subyacentes a dicha enfermedad resulta primordial para una comprensión integral de la misma, y para el desarrollo de posibles diagnósticos tempranos y tratamientos. En este sentido, a nivel local se ha comenzado a estudiar la enfermedad de CMT en un modelo de ratón denominado *Trembler* (Di Tomaso et al. 2022)(Vazquez Alberdi et al. 2022)(Damian et al. 2021)(Kun, Canclini et al. 2012). Esta cepa presenta una mutación genética espontánea que afecta la codificación de una proteína denominada *PMP-22* (Peripheral myelin protein 22). Esta es la encargada de la mielinización en las células de Schwann, generando así una hipomielinización del axón (J. Li et al. 2013). Más específicamente el modelo *Trembler-J* presenta exactamente la misma mutación puntual de la proteína PMP-22 que aparece en humanos con CMT (Valentijn et al. 1992)(Martini, 1997). Esto presenta una gran ventaja a nivel biológico ya que no debe intervenir el modelo para lograr la enfermedad, sino que se da de forma espontánea como herencia genética. Los síntomas que presentan los ratones en este caso son movimientos erráticos, temblores constantes y ocasionales convulsiones que llevan a una esperanza de vida menor (Suter et al. 1992).

Los trabajos recientes a nivel local han abierto la posibilidad de entender esta neuropatía no solamente como una afección a nivel del sistema nervioso periférico sino también debida a componentes del sistema nervioso central. En particular, en el trabajo de (Damian et al. 2021) se muestra que la presencia de PMP-22 en la región del hipocampo, y comportamientos diferenciales en test de ansiedad, indican que dicha región puede jugar un rol preponderante en el desarrollo de la afección.

## 1.5. Objetivos y estructura de la tesis

De esta manera, surgen las siguientes interrogantes: ¿es posible implementar el fUS para analizar esta enfermedad a través del modelo Trembler?, ¿es el fUS suficientemente sensible para detectar alteraciones en la conectividad y la respuesta a un estímulo en el modelo de CMT?, ¿tiene esta enfermedad una alteración del componente neurovascular central? Esta tesis se propone responder estas preguntas, teniendo como objetivo general la implementación del fUS para estudiar el

modelo Trembler y aportar a una mejor comprensión de la enfermedad Charcot-Marie-Tooth.

Para lograr esto nos propusimos una serie de objetivos específicos que permitan ir abriendo el camino. La primera meta fue la implementación de la técnica de Doppler Ultrarrápido, base del ultrasonido funcional. Hasta nuestro conocimiento, es la primera vez que un grupo de investigación nacional o regional utiliza imagenología por ultrasonido para el análisis de la actividad cerebral. Para lograrlo, una primera etapa consistió en familiarizarme con la técnica a través de una revisión bibliográfica y una revisión de los códigos de programación para obtener las imágenes. Luego, desarrollar el dispositivo experimental, que incluyó la puesta a punto de la secuencia de adquisición de imágenes, el diseño de la metodología experimental para adquirir las imágenes en ratones y el flujo de trabajo para el procesamiento de los datos. Esta etapa finalizó una vez desarrollada una metodología lo suficientemente robusta de adquisición de imágenes.

El segundo objetivo intermedio fue aplicar la imagenología Doppler Ultrarrápida para evaluar si resulta suficientemente sensible para detectar variaciones del flujo sanguíneo entre dos grupos. En este caso evaluamos si existen alteraciones a nivel neurovascular entre ratones adultos jóvenes y adultos viejos debidas al envejecimiento. Luego de la adquisición satisfactoria de las imágenes, se procesaron mediante un método de segmentación en distintos niveles de flujo con el objetivo de obtener una caracterización del CBV en cada individuo. Esta novedosa propuesta nos permitió discriminar el flujo de forma eficiente, pudiendo evaluar las diferencias entre grupos, y encontrando un decremento de la perfusión sanguínea en los ratones más viejos. Para validar los resultados obtenidos con imagenología Doppler, los mismos ratones fueron evaluados con la técnica de Microscopía Confocal (MC). Esta técnica ampliamente utilizada en caracterización vascular permite una resolución espacial mucho mayor que el Doppler (en el entorno de los micrómetros). A través de MC se convalidaron los resultados Doppler, hayando en este caso un detrimento de la red vascular en los ratones más viejos. Esto valida la potencialidad del ultrasonido para estudiar diferencias en el flujo sanguíneo cerebral entre distintos modelos neurológicos. Asimismo, la utilización combinada de ambas técnicas contribuye de manera importante a entender la relación entre la red vascular y la perfusión sanguínea, aplicado en este caso a la región del hipocampo. Este trabajo comparativo se condensa y finaliza con la publicación de un artículo científico (Anzibar Fialho; Vázquez Alberdi; Martínez et al. [2022](#)).

El último objetivo específico refiere a la implementación del fUS y su aplica-

ción a ratones Trembler. En este caso se utiliza una adquisición y procesamiento de imágenes similares al caso anterior pero se realiza un rediseño del procedimiento experimental ya que el objetivo es evaluar la variación del CBV en el tiempo. Una vez adquiridos satisfactoriamente los datos para ratones Trembler y ratones sanos, se evalúa la respuesta a un estímulo sensorial específico y se estudia la conectividad en cada grupo. Se definen parámetros para la caracterización de estas dos variables, lo que permite confirmar alteraciones en la activación cerebral y conexión intrínseca en ratones Trembler. Según la bibliografía consultada, esta es la primera vez que se describe una alteración funcional de este tipo para dicho modelo animal, reforzando además los trabajos previos que indican la alteración a nivel del sistema nervioso central.

La estructura de la tesis tiene una correspondencia con los objetivos específicos planteados y acompaña de forma cronológica el desarrollo del trabajo. El primer punto es comprender cómo se adquieren las imágenes por ultrasonido del cerebro y cómo se realizó experimentalmente en nuestro caso. Para ello, en el capítulo 2 se describen los principios físicos detrás de la obtención de imágenes, realizando un desarrollo constructivo de los distintos elementos necesarios para implementar la imagenología Doppler Ultrarrápida, y posteriormente el ultrasonido funcional. En el capítulo 3 se describe el dispositivo experimental utilizado y parte de la metodología general que permite obtener una imagen correcta, especialmente al filtrado de las imágenes para poder obtener la señal de flujo sanguíneo. El capítulo 4 describe los métodos y resultados del trabajo comparativo entre imagenología Doppler y microscopía confocal. La discusión presentada en esta sección confirma la gran capacidad del ultrasonido para estudiar la vasculatura cerebral y sus posibilidades de aplicación. En el capítulo 5 se describe la implementación del fUS y su aplicación al modelo de degeneración Trembler. Los resultados y discusión presentados demuestran la potencialidad del método, así como la gran relevancia biológica para entender en mayor profundidad el modelo de ratón utilizado y la consecuente enfermedad. El capítulo 6 contiene las conclusiones generales del trabajo, y el capítulo 7 las consideraciones que surgen del proceso integral del trabajo en su conjunto y se presentan los posibles trabajos a futuro.

## Capítulo 2

# Imagenología Doppler Ultrarrápida y Ultrasonido Funcional

La imagenología por ultrasonido tiene sus principios básicos en la eco localización, técnica que muchos animales en la naturaleza, como murciélagos o delfines, utilizan como fuente de percepción y ubicación espacial. Esto lo logran emitiendo ondas de sonido y recibiendo dicha onda reflejada luego de ser distorsionada por el medio. Los primeros sistemas de eco localización creados por humanos se utilizaban para la exploración sub acuática, especialmente tras el incidente del Titanic en 1913, el interés por sensar las profundidades del mar cobró una gran relevancia (Szabo, 2004), dando lugar al instrumento conocido como *sonar*.

En los años siguientes a la segunda guerra mundial, tras el desarrollo tecnológico del sonar y el radar, las tecnologías aplicadas a ondas de sonido, puestas ahora a disposición de la medicina, permitieron explorar el interior del cuerpo humano. De esta forma, y tras la invención del reflectoscopio utilizada para localizar defectos en metales, se comenzaron a desarrollar los primeros instrumentos de imágenes médicas utilizando sonido (Szabo, 2004). La velocidad del sonido en los tejidos humanos no presenta una gran variabilidad, esto posibilita una localización precisa en profundidad de distintos objetivos, lo cual se logra a partir de calcular los tiempos de vuelo de las ondas de sonido. El valor establecido para la velocidad del sonido en tejidos blandos es de  $c = 1540$  m/s, y fue medido en 1950 por George D. Ludwig, manteniéndose hasta el día de hoy como el valor estándar utilizado.

Cuando una onda de sonido se propaga en un medio, como el interior del cuerpo humano, su energía será atenuada en función de la distancia. Esto puede ser debido a que la onda es reflejada o dispersada (en inglés *scattering*), o a que la onda es

absorbida por el medio transfiriendo calor al mismo (Shung, 2005). Las imágenes ultrasónicas son formadas a partir de los ecos reflejados en la interfaz de dos estructuras, como también del scattering difusivo debido a inhomogeneidades del medio. Es decir, que el cambio de impedancia acústica de los distintos tejidos presentes en el medio, refleja las ondas de sonido que vuelven al receptor. Debido a que la velocidad del sonido es la misma para todos estos tejidos, entonces la señal proveniente del scattering será característica de la forma y composición de los dispersores allí presentes. Luego, el procesamiento de esta señal permite la reconstrucción del medio en una imagen con una escala representativa de la densidad de dispersores.

Paralelamente, estos avances fueron posibles gracias al desarrollo y entendimiento de nuevos materiales, en especial los denominados *piezoeléctricos*. Estos se caracterizan por sufrir cambios en sus dimensiones físicas al aplicarles un campo eléctrico, y de forma inversa generan una diferencia de potencial interna al aplicarles una deformación (Shung, 2005). Cristales con estas propiedades son la base de cualquier transductor ultrasónico actual. Tomando ventaja de su doble utilidad, por un lado se aplica un campo eléctrico al cristal para generar ondas de sonido a partir de la deformación del material, y en el proceso inverso, son utilizados para la recepción de ondas que deforman el material y transducen el impulso a una señal eléctrica. De esta manera la intensidad de la onda recibida se verá como una variación de potencial eléctrica en la señal.

En especial, la imagenología Doppler (técnica central de este trabajo) es posible gracias a la dispersión de la onda por los glóbulos rojos presentes en el torrente sanguíneo (Angelsen, 1980)(Yuan y Shung, 1988). La capacidad de resolución para ver estos dispersores dependerá de la longitud de onda del sonido que se esté enviando al medio, ya que debe ser del orden del tamaño del dispersor que se quiere observar. Por lo tanto una menor longitud de onda corresponde a una mejor resolución. Sin embargo, cuanto menor es la longitud de onda (o, si consideramos una velocidad constante en el medio, mayor frecuencia) tendremos más atenuación de la onda, por lo tanto existe un compromiso al momento de elegir qué transductor utilizar en función de la aplicación.

## **2.1. Efecto Doppler y Power Doppler**

Algunas de las técnicas ultrasónicas que permiten la visualización del flujo sanguíneo dentro del cuerpo se valen del efecto Doppler, que corresponde al cambio de frecuencia experimentado por una onda cuando hay una variación en la velocidad

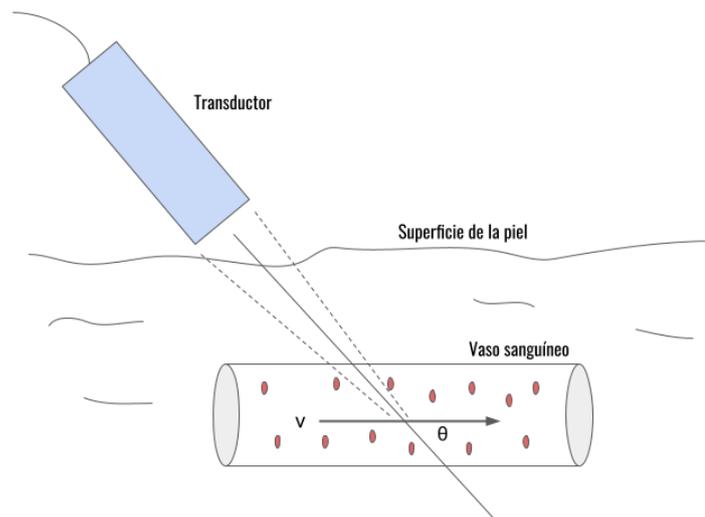
relativa entre la fuente y el receptor. Supongamos que la fuente emite sonido a una frecuencia  $f$  mientras se mueve a una velocidad  $v$  hacia el receptor, que a su vez tiene una velocidad  $u$  en dirección a la fuente, entonces la frecuencia percibida por el receptor estará dada por (Kinsler et al. 2000):

$$f' = f \frac{c + u}{c - v} \quad (2.1)$$

en el caso de que la fuente se aleje del observador  $v$  es negativa, de la misma forma si el receptor se aleja de la fuente entonces  $u$  es negativa. En el caso que  $v \ll c$  y  $u \ll c$  la ecuación anterior se puede simplificar desarrollando a primer orden los términos del numerador y el denominador y obtener la siguiente ecuación:

$$f' = f \left[ 1 + \frac{u + v}{c} \right] \quad (2.2)$$

Lo descrito anteriormente es válido para el caso en que observador y fuente se muevan en la misma línea de dirección, en el caso de que la dirección se de con un ángulo debemos hacer una corrección en la ecuación. Esto es lo que ocurre cuando un transductor envía una onda de sonido al interior del cuerpo para observar el movimiento de la sangre. En este caso la dirección de propagación de la onda acústica y el movimiento de las células del flujo sanguíneo no será siempre paralelo. Como vemos en la figura 2.1 tenemos un ángulo  $\theta$  entre el haz de ultrasonido y la dirección de movimiento de los glóbulos rojos que viajan a una velocidad  $v$ :



**Figura 2.1:** Esquema de insonificación de un vaso sanguíneo con un haz de ultrasonido. El haz y la velocidad de movimiento de los glóbulos rojos presentes en la sangre forman un ángulo  $\theta$ . Adaptado de (Shung, 2005)

en este caso solamente la componente de velocidad paralela al haz es la que ocasionará el cambio en frecuencia, en este caso sería  $v \cdot \cos\theta$ . Utilizando la ecuación 2.2 podemos calcular la frecuencia percibida por el observador (los glóbulos rojos) como:

$$f'_T = f_T \left(1 + \frac{v \cdot \cos\theta}{c}\right) \quad (2.3)$$

donde  $f_T$  es la frecuencia transmitida por el transductor y  $c$  es la velocidad del sonido en el medio. Luego de que la onda es difractada y vuelve al transductor, experimenta un nuevo cambio en frecuencia debido a que la fuente, que ahora son los glóbulos rojos, tienen un movimiento relativo con respecto al observador, que ahora es el transductor. Este cambio en frecuencia sería, a primer orden:

$$f_R = f'_T \left(1 + \frac{v \cdot \cos\theta}{c}\right) = f_T \left(1 + \frac{v \cdot \cos\theta}{c}\right) \left(1 + \frac{v \cdot \cos\theta}{c}\right) \approx f_T \left(1 + \frac{2v \cdot \cos\theta}{c}\right) \quad (2.4)$$

donde  $f_R$  es la frecuencia recibida por el transductor y se utilizó la ecuación 2.3 para la frecuencia de los ecos a partir de los glóbulos rojos. Lo que nos interesa computar es la diferencia entre la frecuencia original emitida por el transductor y la frecuencia final recibida, a la cual llamaremos *Frecuencia Doppler*:

$$f_{Dop} = f_R - f_T = f_T \left(1 + \frac{2v \cdot \cos\theta}{c} - 1\right) = \frac{2v f_0}{c} \cos\theta \quad (2.5)$$

Si invertimos la relación anterior despejando para la velocidad obtenemos:

$$v = \frac{c f_{Dop}}{2 f_0 \cos\theta} \quad (2.6)$$

De esta forma los métodos de imagenología Doppler permiten medir la velocidad de la sangre a partir del cambio en frecuencia experimentado por las ondas de ultrasonido que son enviadas al medio y difractadas por los glóbulos rojos.

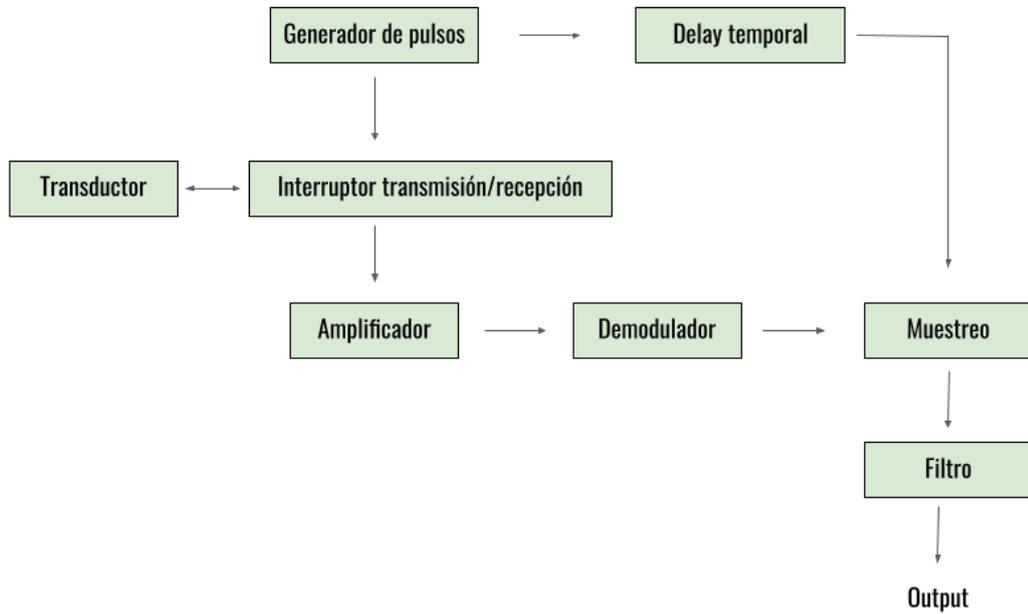
Las primeras técnicas desarrolladas para medir dicha velocidad consistían en enviar ondas de ultrasonido de forma continua al medio y evaluar la frecuencia Doppler a partir de un espectrosonograma, que consiste en mostrar la frecuencia Doppler o velocidad en función del tiempo. Esta señal recibida del medio es lo que denominamos señal Doppler (Szabo, 2004). Para los transductores usados clínicamente, que su frecuencia de emisión varía entre 1-15 MHz, y para velocidades de la sangre típicas en el cuerpo humano, entre 10-100 cm/seg, las frecuencias Doppler caen,

fortuitamente, dentro del rango audible. Por lo tanto los primeros diagnósticos se limitaban a «escuchar» el flujo sanguíneo (Nelson y Pretorius, 1988). En este caso, el transductor se divide en dos piezoeléctricos, uno que se encarga de enviar la onda y otro de recibir.

La principal desventaja presentada por este método es la imposibilidad de diferenciar espacialmente de donde proviene la señal Doppler Shung, 2005. Si tenemos dos vasos muy próximos en la región donde estamos enviando las ondas de sonido, lo que tendremos es una señal global que no permite medir individualmente la velocidad en cada uno de los vasos. Para salvar este problema en vez de realizar una emisión continua se aplicaba una emisión por pulsos de ultrasonido, esto se conoce como Doppler pulsado o *Pulsed Wave Doppler* (PW). La principal ventaja de esto es que podemos controlar la profundidad a la que estamos enviando el pulso de ultrasonido; ya que conocemos la velocidad de propagación en el medio y podemos medir el tiempo que demora en salir y volver el pulso al transductor.

El diagrama de la figura 2.2 muestra los pasos necesarios para obtener la señal Doppler con la técnica de PW. Un generador de pulsos de varios ciclos excita al transductor pasando antes por una compuerta que permite diferenciar entre la recepción y emisión, ya que en este caso se utiliza el mismo piezoeléctrico para ambas funciones. A su vez, el mismo pulso enviado al transductor se almacena con un delay temporal que va a servir para sincronizar o activar el circuito de muestreo. Por lo tanto, en la técnica de PW la frecuencia de muestreo de la señal Doppler estará dada por la diferencia de tiempo entre la emisión de un pulso y el siguiente. Esto se suele denominar *frecuencia de repetición de pulsos* (PRF-pulse repetition frequency). Los ecos que recibe el transductor son amplificados y demodulados a través de la técnica de *muestreo en fase y cuadratura* (Szabo, 2004) (Evans et al. 2011). De forma simplificada, esto consiste en muestrear la señal a un tiempo  $t_0$ , y luego muestrearla un tiempo  $t_0 + T_{PRF}/4$ , donde  $T_{PRF}$  es el periodo de repetición de pulsos  $T_{PRF} = 1/PRF$ . Esto permite separar la señal analógica original en dos señales digitales denominadas I (en fase) y Q (en cuadratura). Esto es imprescindible para poder diferenciar la dirección de movimiento del flujo sanguíneo (Szabo, 2004). Por último, se aplica un filtro para eliminar las frecuencias bajas presentes en la señal Doppler. Estas señales corresponden a movimientos lentos provenientes principalmente de los tejidos aledaños al vaso sanguíneo.

Una contraparte de este método es la velocidad máxima que se puede medir. En este caso estará limitada por el PRF, que, por el teorema de muestreo de Nyquist, debe ser dos veces mayor a la máxima frecuencia Doppler que estemos midiendo.



**Figura 2.2:** Esquema de adquisición de la señal Doppler para la técnica de Doppler pulsado. Adaptado de (Shung, 2005)

De otra forma tendremos *aliasing*, es decir la aparición de frecuencias espurias en la señal debido al submuestreo.

$$PRF > 2f_{D_{max}} > \frac{4v_{max}f_0}{c} \quad (2.7)$$

donde se usó la ecuación 2.6 para un ángulo  $\theta = 0$ . Además el PRF se relaciona con la profundidad de la región donde estamos obteniendo la señal, ya que todos los ecos deben llegar al transductor previo a que se envíe el siguiente pulso, es decir:

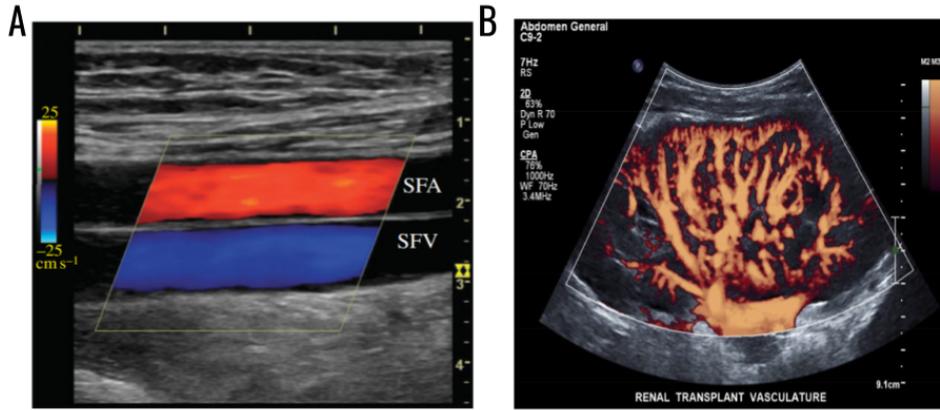
$$T_{PRF} = \frac{1}{PRF} > \frac{2z_{max}}{c} \quad (2.8)$$

por lo tanto juntando las dos ecuaciones anteriores tenemos una velocidad máxima de:

$$v_{max} \leq \frac{c^2}{8f_0z_{max}} \quad (2.9)$$

Una vez que se tiene la señal Doppler se puede analizar de diversas maneras; en primer lugar, al igual que se mencionó para el Doppler de emisión continua, se puede escuchar el espectrosonograma. Otra técnica más avanzada permite superponer un mapa de colores sobre una imagen ecográfica convencional de la región

que se está estudiando donde se da la información de velocidad media en la región de estudio. Esto es conocido como *Color Doppler* (Evans et al. 2011). En la figura 2.3A se observa un ejemplo de esta técnica donde el mapa de colores muestra la magnitud y dirección de la sangre en un arteria y una vena. El valor de velocidad en este caso no se obtiene de una única medición sino haciendo un promedio de la señal Doppler (Kasai et al. 1985) (Angelsen, 1981).



**Figura 2.3:** (A) Imagen tomada de (Evans et al. 2011) donde se muestra la técnica de Color Doppler para medir la velocidad en la arteria femoral superficial (SFA) y la vena femoral superficial (SFV). (B) Imagen en la modalidad Power Doppler de la vasculatura renal. Extraído de (Szabo, 2004)

En último lugar, y de forma más relevante para este trabajo, otra información que se puede obtener de la señal Doppler es su potencia, cuya técnica imagenológica se conoce como *Power Doppler* (Rubin et al. 1994), (Babcock et al. 1996). Esta modalidad es más simple de implementar que el Color Doppler y presenta algunas ventajas importantes para el estudio de ciertos flujos. Matemáticamente, consiste en cuantificar, a partir de la señal Doppler ( $S_{Doppler}(f)$ ), su intensidad, lo que corresponde a la integral de la densidad de potencia espectral (Szabo, 2004):

$$\int_{-\infty}^{\infty} P(f) df = \int_{-\infty}^{\infty} S_{Doppler}(f)^2 df \approx \sum_{n=1}^N I^2(n) + Q^2(n) \quad (2.10)$$

donde  $I(n)$  y  $Q(n)$  son las señales que se obtienen luego del muestreo por cuadratura, siendo  $n$  cada una de las muestras. En los trabajos Rubin et al. 1995 y Rubin et al. 1997 se demuestra que el valor obtenido de la señal de Power Doppler es proporcional al volumen sanguíneo del área muestreada. En el trabajo de Shung et al. 1976 se explica como la señal Doppler está directamente relacionada al scattering producido por los glóbulos rojos presentes en la sangre. De esta forma

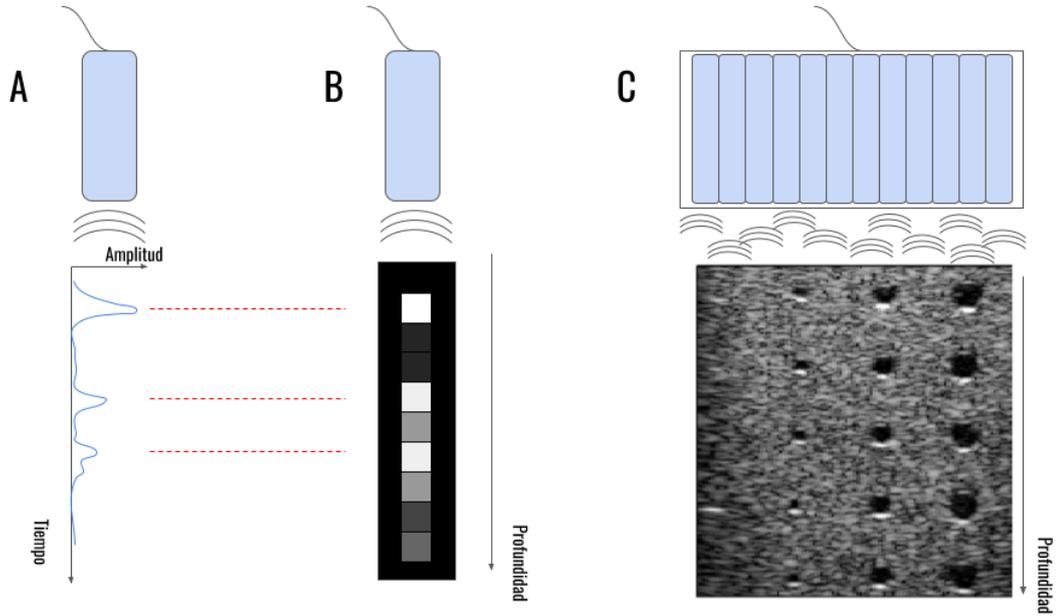
la información obtenida corresponde a la cantidad de glóbulos rojos que se están insonorizando, desplegada como una escala de colores como se muestra en la figura 2.3B. A esta señal de volumen sanguíneo se la denomina *Cerebral Blood Volume* (CBV).

A diferencia del Color Doppler en este caso no tenemos ninguna información de la dirección y velocidad del flujo. Sin embargo, representa ciertas ventajas como la capacidad de detectar señal aun teniendo un flujo perpendicular al haz de ultrasonido, el problema del aliasing es eliminado ya que en este caso no nos importa la velocidad, y las imágenes pueden promediarse para alcanzar una mejor relación señal sobre ruido. De esta forma el Power Doppler resulta ser una técnica mucho más sensible para detectar flujo que el Color Doppler (Babcock et al. 1996). Esto resulta especialmente importante a la hora de observar el flujo en vasos pequeños como los presentes en el cerebro de pequeños animales.

## 2.2. Imagenología Ultrarrápida

Tradicionalmente, la imagenología médica por ultrasonido consiste en focalizar un haz de ultrasonido en una región específica y registrar los ecos producidos por los dispersores presentes en dicha región del medio. Existen múltiples maneras de representación de la señal producida por la retro dispersión o *backscattering*, la más sencilla se conoce como *A-mode*, que consiste en utilizar un único transductor para enviar y recibir un haz de sonido, y graficar la amplitud de la señal de backscattering en función del tiempo (figura 2.4A). En este caso la amplitud es proporcional a un voltaje que corresponde a la excitación del piezoeléctrico que compone el transductor. El tiempo que demora el eco en volver al transductor lo relacionamos, a través de la velocidad del sonido en el medio, con la profundidad del dispersor que genera dicha señal. De esta forma podemos tener una nueva representación denominada *B-mode*, donde la amplitud de la señal recibida se muestra en escala de grises en función de la profundidad (figura 2.4B). Finalmente, utilizando un arreglo de transductores, que se denomina *array*, podemos llegar a la clásica representación en 2 dimensiones espaciales, donde cada punto de la grilla contiene la información de la amplitud del backscattering (figura 2.4C).

Para el caso de la imagen en 2 dimensiones, como la que se observa en la figura 2.4C, debemos considerar que la señal de backscattering proveniente de un punto específico  $(x, z)$  tiene distintos tiempos de recorrido para cada uno de los elementos del array. Tomando como referencia la figura 2.5A vemos que para el elemento



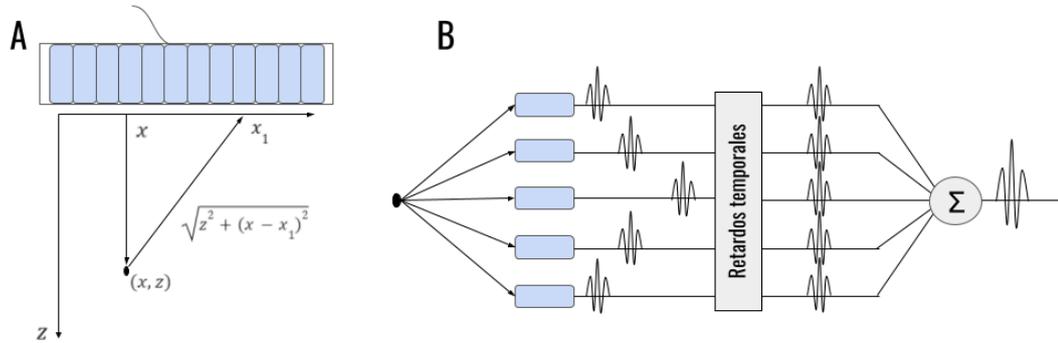
**Figura 2.4:** (A) Esquema de funcionamiento del *A-mode*, donde la información que se obtiene es la amplitud de la señal de backscattering en función del tiempo. (B) Esquema de funcionamiento del *B-mode*, donde la información que se muestra es la amplitud en escala de grises en función de la profundidad. Siendo blanco el mayor valor de amplitud y negro el cero. (C) *B-mode* en 2 dimensiones tomado con un conjunto de piezoeléctricos (transductores). En este caso el transductor es un conjunto de varios piezoeléctricos. Imagen extraída de (Montaldo et al. 2009).

ubicado en la posición  $x_1$  la distancia que debe recorrer el eco proveniente de  $(x, z)$  es  $\sqrt{z^2 + (x - x_1)^2}$ , mientras que para el elemento ubicado en  $x$  dicha distancia es  $z$ . Para una velocidad en el medio de propagación de  $c = 1500m/s$  (valor típico utilizado para el cuerpo humano), entonces estas distancias se pueden expresar en tiempos como  $t = \frac{z}{c}$ . Considerando ahora el recorrido total de la onda de sonido, que sale del elemento  $x$ , viaja al punto  $(x, z)$  y retorna al punto  $x_1$ , podemos escribir el tiempo total como:

$$\tau(x_1, x, z) = \frac{z}{c} + \frac{\sqrt{z^2 + (x - x_1)^2}}{c} \quad (2.11)$$

De esta forma, para cada elemento del transductor el eco proveniente del punto  $(x, z)$  llegará con una diferencia temporal respecto a los demás, esto se ilustra en la figura 2.5B. Para poder sumar las contribuciones de forma coherente y obtener una única señal para dicho punto de la imagen debemos realizar el proceso que se conoce como formación de haz o *beamforming* (Shung, 2005). Este consiste en aplicar un delay temporal a la señal que llega a cada elemento teniendo en cuenta la

ecuación 2.11.



**Figura 2.5:** (A) Esquema de recepción para un elemento ubicado en  $x_1$ . El eco de un haz de ultrasonido emitido en el punto  $x$  y recibido por el elemento  $x_1$  corresponde al sonido viajando hasta un difusor a una profundidad  $z$  y luego una distancia  $\sqrt{z^2 + (x - x_1)^2}$  hasta el elemento  $x_1$ . (B) Para poder sumar coherentemente los ecos producidos por un difusor en  $(x, z)$  se deben aplicar los retardos temporales correspondientes a cada uno de los elementos del array.

La forma tradicional de obtener una imagen de ultrasonido consiste entonces en: focalizar la emisión pulsada de varios elementos en un punto objetivo (esto se hace también a través de retardos temporales pero aplicados a la emisión (Tanter y Fink, 2014)), recibir las señales de backscattering, y aplicar un beamforming para reconstruir una única línea de imagen. Luego, la imagen completa se forma línea por línea, cambiando el punto de focalización para todo el campo de visión del transductor (figura 2.6A).

Sin embargo, esta metodología representa una limitante si se quieren observar procesos que ocurren rápidamente, como puede ser la propagación de una onda mecánica dentro del cuerpo humano o el movimiento de la sangre en algunos vasos. Por lo tanto, para poder estudiar estos procesos se requiere adquirir una gran cantidad de imágenes por segundo. En primer lugar, las limitaciones del ultrasonido convencional se dan porque debemos realizar el beamforming para cada línea previo a pasar a la siguiente, lo cual introduce un tiempo significativo de procesamiento que restringe la cadencia final a 30 o 40 imágenes por segundo (Montaldo et al. 2009). En segundo lugar, y especialmente cuando queremos observar movimientos rápidos como los hemodinámicos, tendremos una falta de sincronización entre los distintos puntos de la imagen; por ejemplo, entre la primera línea de focalización y la última pueden pasar varias décimas de segundo (Mace et al. 2013). Para superar estas dificultades y poder obtener mayor cantidad de frames por segundo se desarrolló lo que

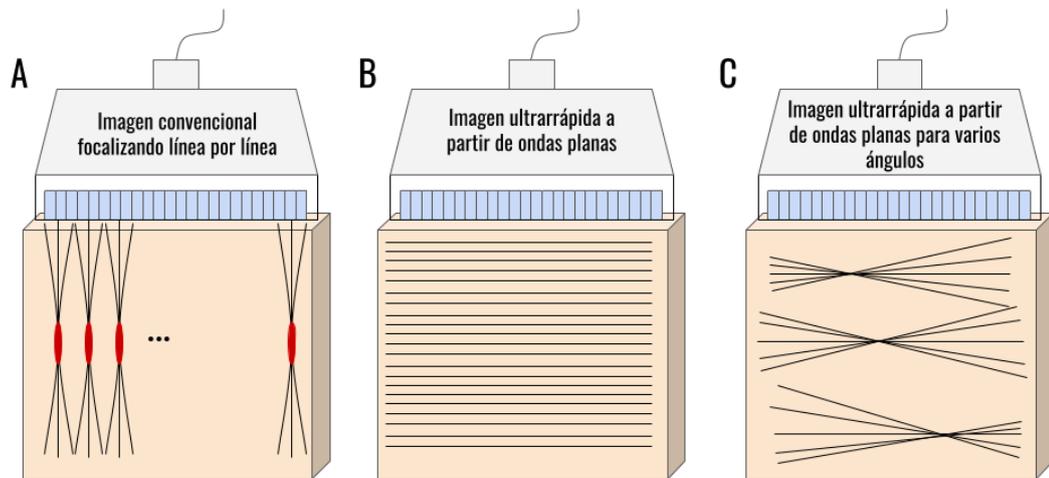
se conoce como *imagenología ultrarrápida* (Montaldo et al. 2009)(Tanter y Fink, 2014)(Bercoff et al. 2011).

Esta técnica consiste en emitir ondas planas con todos los elementos del array para generar una señal de backscattering de todos los puntos de la imagen a la misma vez (figura 2.6B). Luego estos ecos son recibidos y almacenados en la memoria de la computadora. Finalmente, la imagen total se reconstruye a partir de un beam-forming paralelo, ya que en este caso los retardos temporales que se deben aplicar son los mismos para todas las emisiones. De esta forma se aumenta considerablemente la cantidad de frames por segundo que se pueden obtener en comparación al método de focalización, pudiendo conseguir hasta 100 veces más frames en una misma ventana temporal (Bercoff et al. 2011). Sin embargo, la calidad de la imagen se ve afectada y la relación de señal sobre ruido no alcanza los valores obtenidos por el método de focalización (Montaldo et al. 2009). Para ello, se propuso una mejora en la técnica que consiste en emitir ondas planas con diferentes ángulos, recuperando de forma virtual la focalización en distintos puntos de la imagen (figura 2.6). La imagen final en este caso es una imagen compuesta que resulta de sumar las imágenes ultrarrápidas para los distintos ángulos, donde en cada una de ellas los retardos temporales deben contemplar el ángulo de emisión (Montaldo et al. 2009). De esta forma se pueden obtener imágenes de igual calidad que el método de focalización pero con una frecuencia de imagen 16 veces más grande (Bercoff et al. 2011).

### **2.3. Doppler Ultrarrápido y Ultrasonido Funcional**

La imagenología ultrarrápida aplicada a la técnica de Power Doppler trae consigo un importante incremento de la sensibilidad en las imágenes. Es decir, aumenta la capacidad de detectar señal de flujo con intensidades muy pequeñas en relación a las fluctuaciones propias de la técnica. La capacidad de adquirir una gran cantidad de imágenes por segundo y la baja velocidad de la sangre en la neurovasculatura (varía entre 0.5 y 1.5mm/s, Ivanov et al. 1981) permiten que las señales sean promediadas, incrementando de esta forma la relación señal sobre ruido (Mace et al. 2013). Esto es especialmente importante para poder muestrear la vasculatura cerebral ya que el flujo en pequeños vasos se vuelve difícil de detectar mediante los métodos tradicionales de imagenología Doppler.

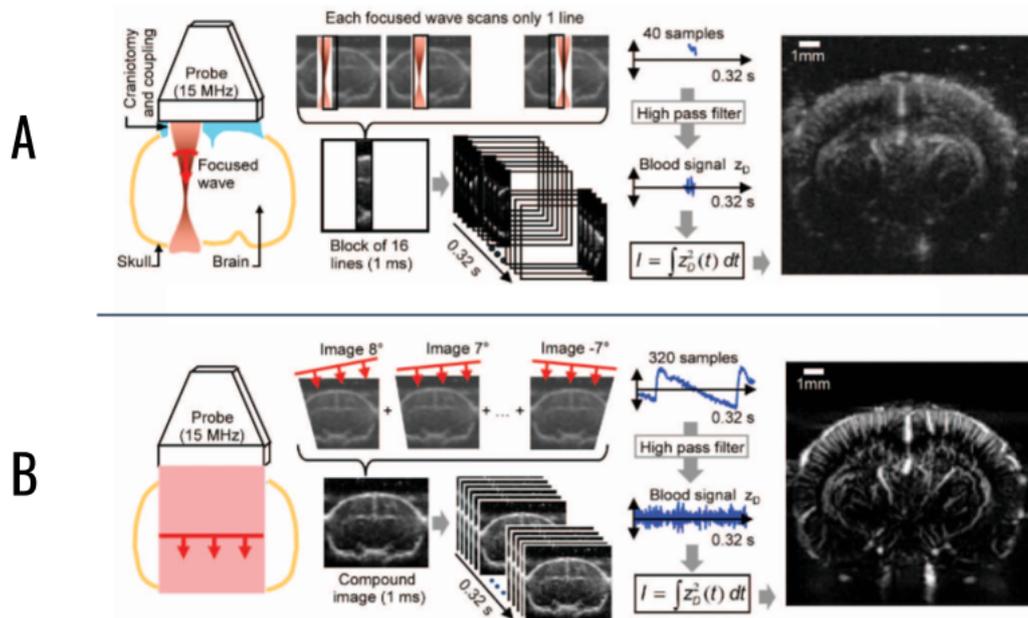
En la figura 2.7 se comparan la metodología y resultados alcanzados con ultrasonido convencional de focalización, y lo equivalente para el doppler ultrarrápido aplicado a la vasculatura cerebral. En el caso del ultrasonido convencional (figura



**Figura 2.6:** (A) Esquema de la técnica convencional para imágenes de ultrasonido. Se focaliza en distintos puntos de la región de interés para ir construyendo la imagen final línea por línea. (B) Para la imagenología ultrarrápida se emiten ondas planas y reconstruye toda la región de interés para un mismo instante. (C) Para incrementar el contraste en la imagenología ultrarrápida se emiten ondas planas con distintos ángulos, recuperando de manera virtual, al momento de hacer el beamforming, la focalización en distintas partes de la imagen.

2.7A) la imagen se subdivide en bloques de 16 líneas, donde cada una de ellas es adquirida mediante focalización en aproximadamente  $1ms$ . Luego para cada bloque se toman unas 40 imágenes, y se continua al siguiente bloque hasta muestrear toda la región deseada, teniendo esto un tiempo final de  $0.32s$ . Por lo tanto para cada punto de la imagen solo se obtuvieron 40 muestras en el tiempo total de adquisición. En el caso del Doppler Ultrarrápido (figura 2.7B) se emiten 16 ondas planas a distintos ángulos y se suman para formar una única imagen compuesta de todo el cerebro en un tiempo de  $1s$ . Luego, para un tiempo de  $0.32s$  se pueden obtener 320 imágenes compuestas que se promedian y filtran para alcanzar la imagen final. En este caso cada punto de la imagen fue muestreado unas 320 veces, unas 8 veces más que en el caso anterior. En los resultados de ambos métodos se puede observar de forma clara el importante incremento en la sensibilidad para detectar vasos sanguíneos.

La implementación de esta técnica combinada se dió inicialmente en los trabajos de Bercoff et al. 2011 y Mace et al. 2011. En el primero de ellos se compara el método tradicional de imagenología por focalización del haz con la imagenología ultrarrápida aplicada a la visualización de flujo. Donde se demuestra la viabilidad de la nueva técnica desarrollada en incrementar la cadencia de imagen, así como la mejora en resolución, sensibilidad y capacidad de discriminar entre flujo y tejido.



**Figura 2.7:** Adaptado de (Mace et al. 2013) en la que se compara: (A) la metodología de ultrasonido convencional focalizando línea a línea para las distintas partes de la imagen, lo que genera una baja cadencia de imagen resultando en pocos puntos de muestreo para observar el flujo vascular, finalmente se muestra el resultado de imagen obtenida, y (B) metodología e imagen final alcanzada con la técnica de Doppler Ultrarrápido, la cual a partir de la emisión de ondas planas posibilita un incremento en la cadencia de imagen, resultando en una mejor capacidad de detectar flujo en pequeños vasos del cerebro.

Se concluye que el Doppler Ultrarrápido es una técnica capaz de obtener información con alta resolución espacial y temporal simultáneamente, permitiendo realizar análisis a tiempo real de la dinámica vascular.

El segundo trabajo explora la utilización del Doppler Ultrarrápido para hacer un análisis funcional aplicado a la vasculatura cerebral en pequeños animales. Este estudio sienta las bases para lo que se conoce como *Ultrasonido Funcional* (fUS, por sus siglas en inglés), que corresponde a evaluar la respuesta neurovascular a un estímulo sensorial específico. La actividad neurológica conlleva un incremento en la necesidad de oxígeno por parte de las neuronas, que se manifiesta en un necesario aumento del flujo sanguíneo hacia dichas células. Este sistema conjunto de neurona-vasculatura se denomina *acoplamiento neurovascular* (Iadecola, 2017) y es la clave del fUS. Esta asociación permite que el estudio de la dinámica vascular sea representativa de la actividad neurológica subyacente. En la publicación de Mace et al. 2011 se describe la metodología para evaluar la respuesta al movimiento de las vibras en ratas y su correspondiente activación en la corteza cerebral. Esto se logra

gracias a la capacidad del fUS de adquirir imágenes cada 1 segundo permitiendo así evaluar la evolución del flujo sanguíneo en las distintas partes del cerebro. No solamente se demuestra su capacidad de observar la respuesta a estímulos sino que se aplica al estudio de la propagación de un episodio de epilepsia cerebral inducida.

De esta forma el fUS se sitúa como una técnica de gran capacidad para estudiar la dinámica del cerebro, principalmente debido a su resolución espacio-temporal, su profundidad de observación y portabilidad (ver sección "Últronido funcional aplicado al campo de la neurociencia" del capítulo 1). El trabajo de tesis aquí presentado basa su metodología en lo desarrollado por Mace et al. [2011](#). Para ello se tomaron imágenes del flujo sanguíneo cerebral de ratones con el objetivo de explorar nuevas capacidades de la imagenología Doppler Ultrarrápida y la implementación del ultrasonido funcional para estudiar la conectividad cerebral.

# Capítulo 3

## Dispositivo experimental

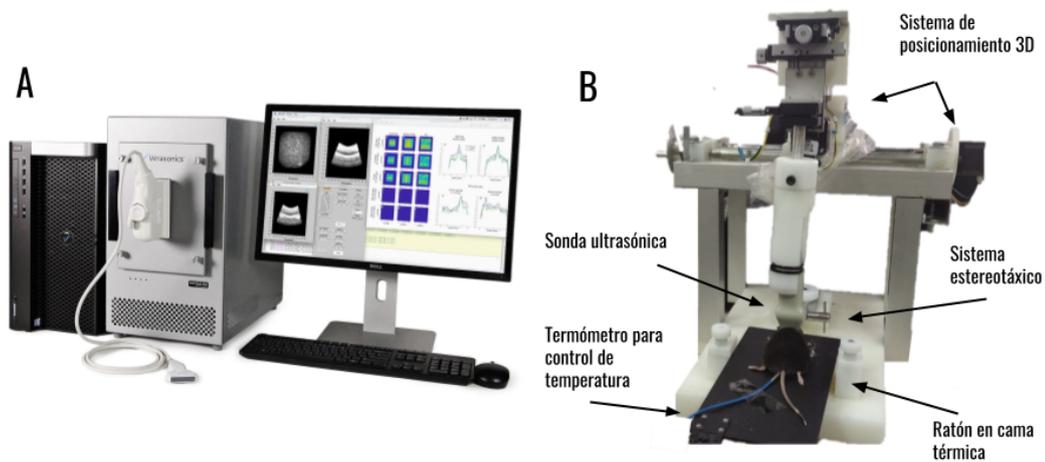
Como se mencionó anteriormente el objetivo experimental es adquirir imágenes Doppler Ultrarrápidas del cerebro de ratones. En este capítulo se explica el instrumental utilizado, el procedimiento para adquirir los datos, el procesamiento necesario para obtener una imagen de flujo y los modelos animales utilizados.

### 3.1. Secuencia de adquisición de imágenes

Para poder implementar la imagenología Doppler ultrarrápida, y posteriormente el Ultrasonido Funcional, necesitamos de un ecógrafo programable que permita generar la secuencia de adquisición necesaria para cada caso. De esta forma se usó un sistema Vantage de Verasonics como se muestra en la figura 3.1A. Este equipo tiene un módulo de conexión de 256 elementos lo que permite utilizar sondas de igual o menor cantidad de elementos. En nuestro caso se utilizó una sonda de la marca Vermon de 15MHz de frecuencia central con 128 elementos integrando un array lineal. El paso entre elemento y elemento es de 0.1mm.

Previo a adquirir las imágenes los animales se colocan en un sistema estereotáxico como el que se muestra en la figura 3.1B. Este permite fijar la cabeza del animal y colocar la sonda en un sistema de posicionamiento de tres dimensiones para alinearla con el plano coronal del cerebro. En las tres direcciones el paso del movimiento es 0.1mm. Adicionalmente se utiliza una cama térmica (Physitemp HP-1M) conectada a un control de temperatura continuo (Physitemp TCAT-2DF y Physitemp RET-3) que mantiene al ratón en el entorno de los 37°C.

El proceso de adquisición de las imágenes, mostrado en la figura 3.2, comienza por alinear la sonda ultrasónica al plano coronal. Debido a que la velocidad del so-

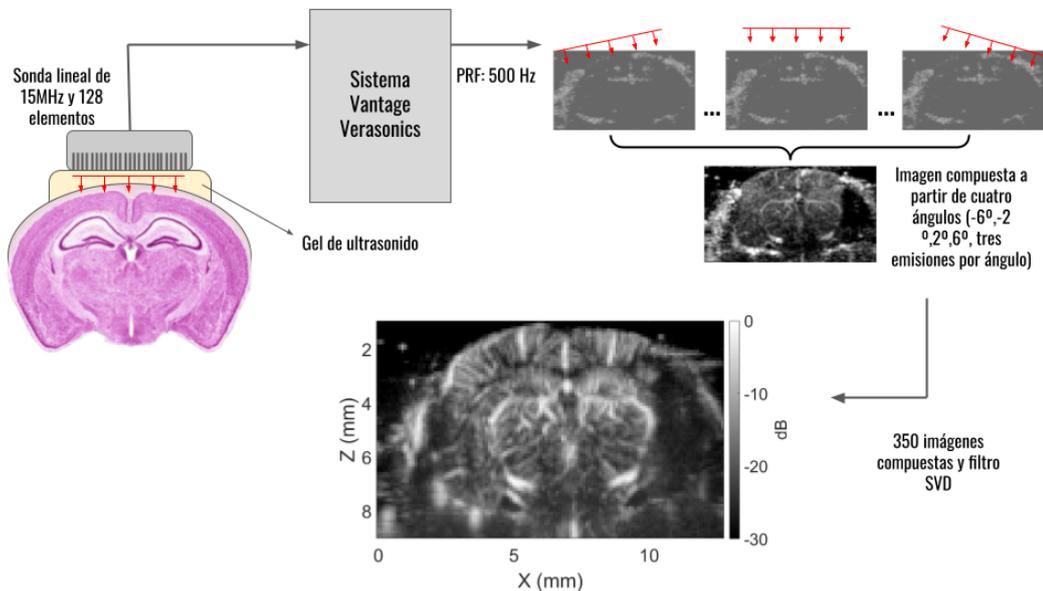


**Figura 3.1:** (A) Imagen del sistema Vantage de Verasonics utilizado para adquirir las imágenes. (B) Sistema de posicionamiento estereotáxico donde se coloca el ratón junto a la cama térmica y la sonda alineada a su cabeza.

nido en el aire es mucho menor a la velocidad en el tejido corporal se utiliza un gel de ultrasonido para acoplar ambos medios y permitir que las ondas lleguen al cerebro. La sonda de emisión-recepción está controlada por el sistema Verasonics que contiene el código para la secuencia de adquisición. La frecuencia de muestreo del ultrasonido corresponde a  $500\text{Hz}$  y se emiten ondas planas para 4 ángulos distintos ( $-6^\circ$ ,  $-2^\circ$ ,  $2^\circ$ ,  $6^\circ$ ), donde se realiza un promedio de 3 emisiones y recepciones por cada uno de ellos. La adición coherente de las imágenes para los distintos ángulos, es decir realizar el beamforming correspondiente, da como resultado lo que llamamos la imagen compuesta. Una imagen Doppler corresponde al promedio de 350 imágenes compuestas.

Por lo tanto, tenemos una matriz de 2 dimensiones espaciales, en este caso de  $128 \times 82$  píxeles (para las imágenes presentadas en el capítulo 5 el tamaño es  $128 \times 41$ ), donde el tamaño del píxel es  $(0.1 \times 0.1)\text{mm}$ , y una dimensión temporal correspondiente a las 350 imágenes compuestas. Finalmente para obtener la imagen que se muestra en la figura 3.2 se aplica un filtro espacio-temporal de descomposición en valores singulares (como se explica en la siguiente sección) y se promedian las 350 imágenes compuestas. El tiempo total para adquirir una imagen Doppler es de 1 segundo. Como se explicó en el capítulo anterior, la intensidad de la imagen corresponde al CBV medido para cada píxel, en este caso computado como decibeles (dB).

El código utilizado en el ecógrafo fue escrito por Dr. Javier Brum y Dr. Jerome



**Figura 3.2:** Flujo de adquisición para una imagen Doppler. La sonda ultrasónica se alinea al plano coronal y se conecta al sistema Verasonics. Con una frecuencia de muestreo de  $500\text{ Hz}$  se obtiene una imagen compuesta a partir de 12 emisiones de ondas planas (4 ángulos y 3 emisiones por ángulo). La imagen final es el promedio de 350 imágenes compuestas que se filtran a partir de una descomposición en valores singulares (SVD).

Baranger, en base a códigos anteriores desarrollados por el grupo de investigación Physics for Medicine (<https://www.physicsformedicine.espci.fr/>). En esta tesis se realizó la revisión de todos los procesos computacionales involucrados, se modificaron los parámetros necesarios para el equipamiento disponible y se efectuaron las actualizaciones necesarias.

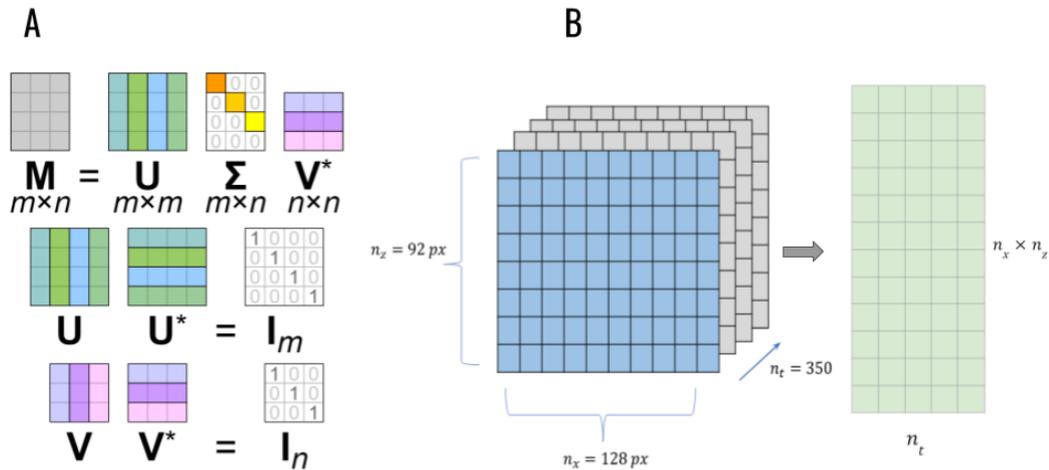
### 3.2. Filtro espacio-temporal para imágenes Doppler

Luego de la adquisición de la imagen es necesario la aplicación de un filtro para eliminar información no deseada presente en las mismas. Adicionalmente a las fluctuaciones relacionadas al flujo sanguíneo, existe un movimiento de tejido, de baja frecuencia, correspondiente a los movimientos propios del organismo del animal. Convencionalmente esta señal de baja frecuencia se elimina utilizando un filtro pasa alto. Sin embargo, trabajos más recientes han propuesto la utilización de un filtro espacio-temporal conocido como *descomposición en valores singulares* (SVD por sus siglas en inglés) (Baranger et al. 2018) (Demene et al. 2015).

La descomposición en valores singulares es una técnica ampliamente utilizada en matemática y con aplicación en muchas áreas. La misma consiste en factorizar

una matriz en función de autovalores y autovectores. El uso en tratamiento de imágenes viene dado por el hecho de que las imágenes adquiridas corresponden a una matriz de datos tridimensional, es decir una imagen en dos dimensiones y la tercera dimensión temporal para las distintas imágenes, donde cada entrada de la matriz representa la señal de Doppler de un punto del espacio.

El objetivo de esta técnica es descomponer una matriz  $M$ , real o compleja, de tamaño  $m \times n$  en una factorización de la forma  $M = U\Sigma V^*$ , donde  $U$  es una matriz real o compleja de  $m \times m$ ,  $\Sigma$  una matriz rectangular diagonal con valores reales no negativos en la diagonal y  $V$  es una matriz real o compleja de  $n \times n$  (ver figura 3.3A). Las entradas diagonales  $\sigma_i$  de  $\Sigma$  son conocidos como valores singulares de  $M$ . Las columnas de  $U$  y  $V$  son conocidos como vectores singulares izquierdos y vectores singulares derechos de  $M$  respectivamente. De esta forma, la matriz  $M$  mapea la base de vectores  $V_i$  con el vector unitario  $\sigma_i U_i$ . Al ser matrices unitarias lo mismo ocurre para sus transpuestas conjugadas  $U^*$  y  $V$ .



**Figura 3.3:** Representación visual de la factorización de una matriz en valores singulares. Las matrices asociadas a los vectores temporales ( $V$ ) y los vectores espaciales ( $U$ ) son singulares. Adaptado de: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Singular-value-decomposition-visualisation.svg>

Los datos ultrasónicos de la forma  $s(x, z, t)$  de tamaño  $(n_x, n_z, n_t)$  se pueden reorganizar en una matriz  $S$  de tamaño  $(n_x \times n_z, n_t)$  (figura 3.3B). Es decir que cada fila de la matriz  $S$  corresponde a la señal temporal de un píxel de la imagen ultrasónica. Luego la matriz se puede descomponer de la forma:

$$S = U\Delta V^* \quad (3.1)$$

las matrices  $U$  y  $V$  ( $V^*$  es la transpuesta conjugada) son ortonormales y de tamaño  $(n_x \times n_z, n_x \times n_z)$  y  $(n_t, n_t)$  respectivamente, y contienen, en sus columnas, los vectores singulares espaciales y temporales de  $S$ . A su vez,  $U$  y  $V$  contienen los autovectores de las matrices de covarianza  $SS^*$  y  $S^*S$  respectivamente. La matriz  $\Delta$  es de tamaño  $(n_x \times n_z, n_t)$  con coeficientes  $\sigma_k$  en su diagonal ordenados de forma decreciente. La interpretación que podemos hacer de la descomposición SVD es pensar a la matriz  $S$  como una suma ponderada de varias matrices  $A_i$ , más específicamente como el producto tensorial  $A_i = U_i \otimes V_i$  (Baranger et al. 2018). De esta forma la matriz  $S$  se puede escribir como:

$$S = \sum_i \sigma_i A_i = \sum_i \sigma_i U_i \otimes V_i \quad (3.2)$$

donde  $U_i$  y  $V_i$  son las columnas de las matrices definidas en la descomposición SVD y  $\sigma_i$  los valores singulares ordenados en forma decreciente. Cada vector  $V_i$  corresponde a una señal temporal de largo  $n_t$  y cada vector  $U_i$  corresponde a una señal espacial de largo  $n_x \times n_z$ . De hecho cada vector  $U_i$  describe una imagen espacial de dos dimensiones  $I_i$  de dimensiones  $(n_x, n_z)$ . Por lo tanto, la descomposición SVD lo que hace es separar a la matriz  $S$  en imágenes  $I_i$  que son independientemente moduladas por una señal temporal  $V_i$ . Es decir todos los píxeles de la imagen  $I_i$  se comportan de la misma forma temporal como  $V_i$ .

De esta forma las señales ultrasónicas espacio temporales  $s(x, z, t)$  se reescriben como:

$$s(x, z, t) = \sum_i^{\text{rango}(S)} \sigma_i I_i(x, z) V_i(t) \quad (3.3)$$

Así las señales correspondientes al tejido, con mayor energía y coherencia espacial de sus píxeles en el tiempo, se concentran en los primeros valores singulares. De lo contrario la señal del flujo se encuentra en los valores singulares más chicos debido a su escasa coherencia espacio temporal.

Por lo tanto, si queremos eliminar los primeros  $N$  valores singulares, se coloca un filtro a la matriz  $S$  lo cual corresponde a calcular:

$$S^f = S(VI^fV^*) = (SVI^f)V^* = U\Delta^fV^* \quad (3.4)$$

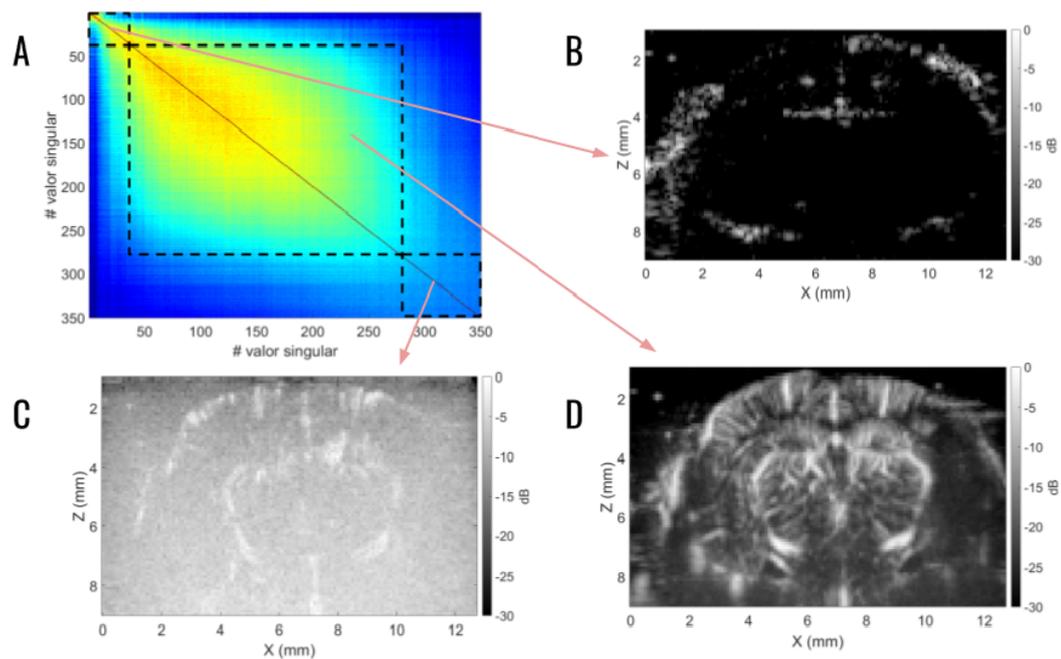
donde  $S^f$  es la matriz filtrada y  $I^f$  es la matriz identidad con ceros en los primeros  $N$  valores de la diagonal, por lo tanto  $\Delta^f$  es la matriz que contiene en la diagonal los restantes valores singulares.

Existen diversos criterios que se pueden aplicar utilizando la descomposición en valores singulares para realizar el filtro sobre una imagen. En este caso nos basamos en los estimadores correspondientes a los vectores singulares espaciales. Los demás métodos se pueden ver en la sección correspondiente del Anexo 1. Lo que se busca en este caso es poder determinar el subespacio de los vectores espaciales asociado al flujo sanguíneo. A partir de la ecuación 3.2, la matriz  $S$  se puede escribir como la suma de múltiples matrices  $u_k v_k^*$  de tamaño  $(n_x \times n_z, n_t)$  ponderadas por el valor singular  $\sigma_k$ , donde  $u_k$  y  $v_k$  son los vectores columna de las matrices  $U$  y  $V$  respectivamente:

$$S = \sum_{k=1}^{n_t} \sigma_k \cdot u_k v_k^* \quad (3.5)$$

Cada vector  $u_k$  de tamaño  $(n_x \times n_z, 1)$  se puede reordenar en una imagen 2D de tamaño  $(n_x \times n_z)$ . Por lo tanto, cada matriz  $u_k v_k^*$  se puede pensar como una imagen de intensidad  $|u_k|$  modulada en el tiempo por la señal  $v_k$ . Si consideramos que la señal de tejido y la señal de flujo tienen distinta distribución espacial, entonces los vectores  $|u_k|$  deben correlacionarse con los subespacios correspondientes a tejido y flujo, pero no entre ellos. Esperamos que el tejido se encuentre en todo el campo de visión de la imagen y presenta una alta correlación temporal y espacial, mientras que el flujo se restringe solamente a la red vascular presentando una menor correlación espacial y temporal. Por lo tanto, si calculamos la matriz de correlación de  $|u_k|_{k \in [1, n_t]}$  de tamaño  $(n_t, n_t)$  deberíamos visualizar los distintos subespacios. Como se puede observar en la figura 3.4A los subespacios correspondientes al tejido y al flujo se separan en cuadrados de correlación que contienen los valores singulares correspondientes. A partir de los valores en el primer subespacio se puede reconstruir una imagen únicamente de tejido como se ve en la figura 3.4B. Para los valores singulares restantes se puede realizar una nueva separación en un subespacio de flujo y un subespacio de ruido como se ve en la figura 3.4A. Se espera que el ruido presente sea aleatorio por lo tanto los vectores asociados deberían mostrar una muy baja correlación. De forma análoga a lo anterior, si ahora se toman los valores singulares asociados al ruido, en este caso se obtiene una imagen compuesta únicamente por el ruido (figura 3.4C). Finalmente, los valores singulares restantes que

no fueron asociados al tejido o al ruido se corresponden con la señal de flujo como se ve en la figura 3.4D. Por lo tanto, un nuevo estimador del filtro SVD corresponde a encontrar la frontera entre estos 3 subespacios. De esta forma se realiza un doble filtro eliminando el movimiento de tejido y ruido de la señal al mismo tiempo.



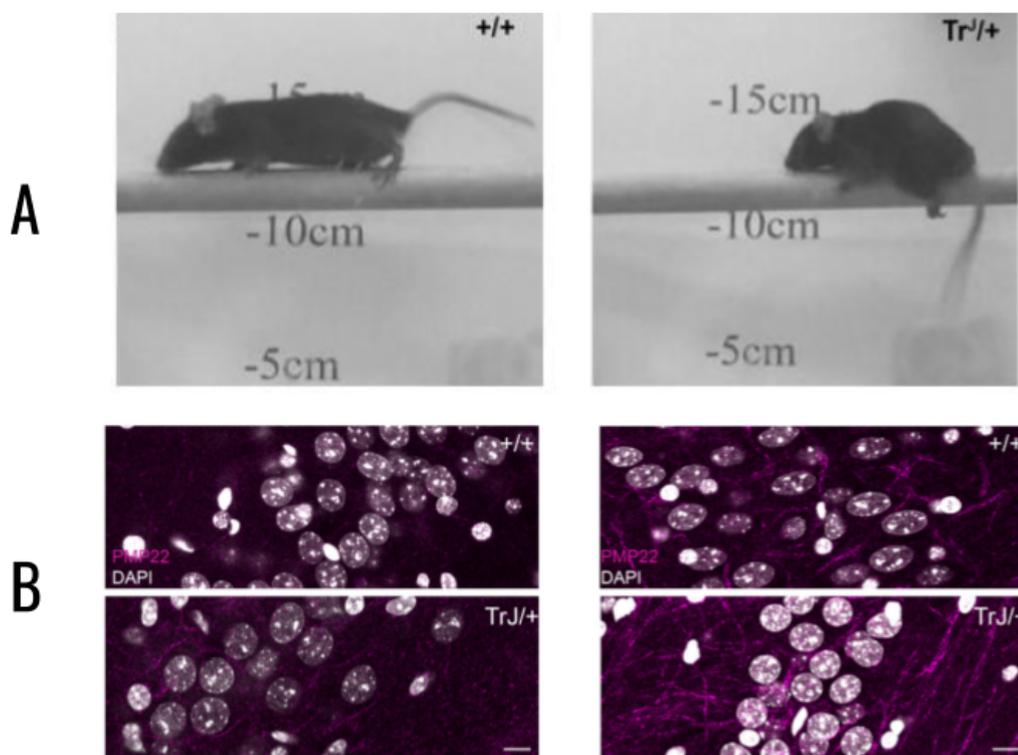
**Figura 3.4:** Observando la matriz de correlación de los vectores espaciales (A) se puede realizar una descomposición de la imagen original en distintos subespacios asociados al movimiento de tejido (B), el ruido (C) y el flujo sanguíneo (D). La escala de colores representa decibeles. Se observa claramente como los valores singulares de mayor energía se asocian al tejido.

### 3.3. Modelos animales utilizados

Como se mencionó en la introducción el modelo de mayor interés para este trabajo corresponde al denominado Trembler, asociado con la enfermedad Charcot-Marie-Tooth. Como se observa en la figura 3.5A estos ratones presentan alteraciones comportamentales debido a la afección de sus miembros. Más específicamente incapacidad de mantener un equilibrio estable, de controlar adecuadamente el movimiento de sus extremidades, altos niveles de ansiedad y temblores constante. Debido a esto, la manipulación para aplicar la anestesia se hace más difícil, pero una vez anestesiados y dormido el ratón no presenta un temblor constante. Esto es esencial para lograr buenas imágenes ya que el movimiento imposibilita la medición

del flujo sanguíneo.

En la figura 3.5B se observan parte de los resultados del trabajo de Damian et al. 2021, donde se muestra la expresión de la proteína PMP22 a nivel del hipocampo para ratones Trembler y ratones sanos. La alteración de esta proteína a nivel del sistema nervioso central representa un hallazgo importante debido a que la enfermedad es clasificada hasta el momento como periférica, afectando únicamente a las células de Schwann de dichos nervios. Por otro lado, el hipocampo resulta de especial interés ya que interviene en los procesos de aprendizaje y memoria, así como de neurogénesis, por lo tanto involucrado directamente en el desarrollo del individuo.



**Figura 3.5:** (A) Imágenes tomadas del trabajo de (Rosso et al. 2010), donde se describen las diferencias fenotípicas y de comportamiento entre ratones Trembler y WildType. Como se puede observar el modelo Trembler presenta dificultades motrices fácilmente observables y cuantificables en distintos experimentos. (B) Imágenes tomadas de (Damian et al. 2021) donde se muestra una expresión diferencial de la proteína PMP22 a nivel del hipocampo para el modelo Trembler en comparación al WildType.

Por otro lado, el modelo *Wild Type C57BL/6* (WT) es la cepa más utilizada en investigación biomédica gracias a su robustez genética y capacidad como modelo fisiológico análogo a los humanos (Bryant, 2011). A nivel cerebral se utilizó como base para la construcción histológica de los principales Atlas de referencia (Paxinos

y Franklin, 2019)(Dong, 2008). Además de utilizar este modelo como grupo de control frente al modelo de neurodegeneración (capítulo 5), se utilizó para el estudio presentado en el capítulo 4. En este caso se trabajó exclusivamente con ratones WT, separándolos en un grupo de adultos jóvenes (5 meses de edad aproximadamente) y un grupo de adultos viejos (21 meses aproximadamente). En dicha sección se estudian los efectos del envejecimiento utilizando imagenología Doppler Ultrarrápida para evaluar la dinámica vascular de ambos grupos.

## Capítulo 4

# Estudio combinado entre imagenología Doppler Ultrarrápida y Microscopía Confocal

En este capítulo se busca alcanzar los primeros dos objetivos específicos mencionados en la introducción: implementar la técnica de imagenología Doppler Ultrarrápida y evaluar la sensibilidad del método para detectar variaciones en el flujo sanguíneo para dos grupos de ratones distintos. En este sentido, se obtuvieron imágenes Doppler en ratones WildType adultos jóvenes y viejos para estudiar el envejecimiento neurovascular, y se convalidaron los resultados con la técnica de imagenología por Microscopía Confocal.

El envejecimiento o cambios orgánicos causados por la edad alteran el funcionamiento neurovascular. Modifican la capacidad de reserva de los vasos sanguíneos generando cambios a nivel celular (Novak y Hajjar, 2010), (De Silva y Faraci, 2016), (Kirschen et al. 2018), y compromete las funciones de transporte de oxígeno y nutrientes asociadas al flujo vascular cerebral, teniendo consecuencias a nivel cognitivo, de memoria o funciones ejecutivas (Dolan et al. 1992), (Liddle et al. 1992), (Cervos-Navarro y Diemer, 1991), (Schmidt-Kastner y Freund, 1991).

El ultrasonido ultrarrápido es una técnica In-Vivo que permite obtener información del flujo neurovascular mientras el animal se encuentra con vida, y ha demostrado ser una potente herramienta para estudiar la dinámica vascular del cerebro (Mace et al. 2011). Si bien la técnica se ha utilizado principalmente para realizar estudios funcionales de la vasculatura cerebral, en este trabajo exploramos la utilidad de analizar el flujo medido en una única imagen como característica neurovascular.

Por otro lado, la Microscopía Confocal Láser de barrido (o simplemente microscopía confocal, MC) es una técnica post-mortem de imagenología óptica, capaz de obtener planos cerebrales o representaciones 3D de las estructuras vasculares, con una resolución espacial en el orden de los nanómetros (Pawley, 2006). Es una técnica ampliamente probada en su capacidad de estudiar con efectividad la red vascular a nivel de arterias, venas, venulas, arteriolas y capilares (Daly, 2019), (Tsuji et al. 2021), (Mateus Goncalves y Almaca, 2021), (Arciniegas et al. 2021), (An et al. 2020).

El objetivo de combinar estas técnicas es estudiar la relación entre la medidad de CBV obtenida por Doppler Ultrarrápido y la estructura vascular medida con MC. Para ello nos centramos en analizar la región del hipocampo, la cual posee una capacidad neurogénica única en mamíferos, e interviene en importantes procesos cognitivos y de memoria (Altman y Das, 1965), (Eriksson et al. 1998) (Moreno-Jiménez et al. 2019), (Sahay y Hen, 2007).

Desarrollamos un método de segmentación de la imagen Doppler de forma tal que permitiera revelar la estructura vascular del hipocampo. Luego, comparamos dichos resultados con la caracterización de la red vascular obtenida de las imágenes de MC. A partir de este método logramos relacionar cualitativamente el flujo con la estructura de la red vascular.

Mi contribución al estudio consistió en poner a punto la técnica para obtener las imágenes Doppler, realizar la adquisición de las mismas y desarrollar el procesamiento de datos para la segmentación y cuantificación del flujo. El manejo animal, fijación del cerebro, obtención de imágenes por microscopía confocal y procesamiento de dichas imágenes fue realizado por el grupo de Proteínas y Ácidos Nucleicos del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

## **4.1. Adquisición y procesamiento de imágenes Doppler Ultrarrápidas**

Para el estudio presentado en esta sección utilizamos ratones WildType de 5 meses (n=6) y 21 meses (n=6) de edad. En todos los casos los ejemplares fueron machos. Todos los animales fueron adquiridos de los laboratorios Jackson y crecidos en el bioterio del IIBCE bajo condiciones ambientales controladas (12 horas de oscuridad y 12 horas de luz) con una temperatura promedio de  $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , sin restricción calórica o de agua. Todos los experimentos fueron llevados a cabo ba-

jo el protocolo aprobado 002a/10/2020 establecido en Uruguay (ley 18611), y de acuerdo a la guía presentada por ARRIVE (Du Sert et al. 2020).

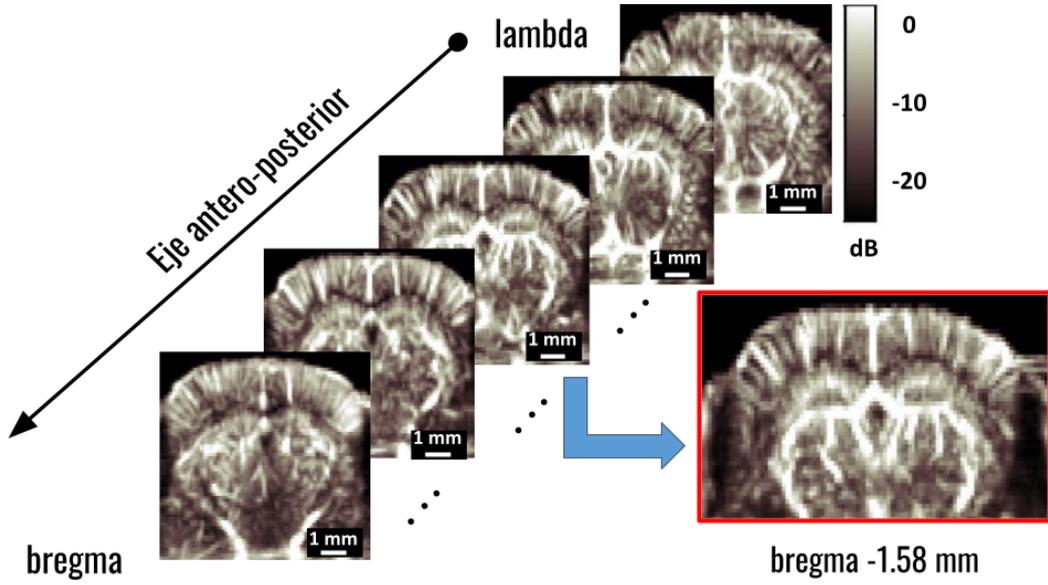
Para anestesiarse a los animales se disuelven 120mg/kg de ketamina (Vetanarcol, König) y 16 mg/kg de xylazina (Xylased\*2, Vetcross) en una solución salina para un volumen final de 300 $\mu$ l. Luego, se administramos la mitad de la dosis a través de una inyección intraperitoneal y se inspecciona visualmente al ratón hasta que quede totalmente anestesiado. Finalmente, a través de una intervención quirúrgica se abrió una ventana craneal de 4  $\times$  6 mm<sup>2</sup> correspondiente a la región entre Bregma y Lambda (figura 4.1). Esto permite dejar el cerebro a descubierto para que las ondas de sonido puedan ingresar al mismo sin distorsiones por estructuras duras. Para comenzar a adquirir las imágenes posicionamos al ratón en el sistema estereotáxico como se muestra en la figura 3.1.



**Figura 4.1:** Esquema de la cirugía realizada en el cráneo para dejar al descubierto el cerebro. Se realiza una ventana craneal de 4  $\times$  6 mm<sup>2</sup> en la región comprendida entre Bregma y Lambda.

Para la adquisición de las imágenes Doppler utilizamos el procedimiento descrito en la figura 3.2. En este caso las imágenes tienen un tamaño de  $N_x = 128$  por  $N_z = 92$  píxeles. Realizamos un escaneó en el eje antero-posterior de planos coronales para la región comprendida entre Bregma y Lambda (figura 4.2). La separación entre planos es de 0.1 mm y cada plano corresponde a realizar un promedio de 20 imágenes Doppler. Para el análisis que se describe a continuación seleccionamos un plano correspondiente a -1.58 mm de bregma aproximadamente.

El siguiente paso correspondió a aplicar el filtro de descomposición en valores singulares (SVD). Para estas imágenes los valores de corte óptimos ( $N_{tejido}$  y  $N_{ruido}$ ) se seleccionaron para maximizar la relación señal de sangre sobre ruido (signal to noise ratio, SNR) proveniente del movimiento del tejido y del ruido propio



**Figura 4.2:** Escaneo de imágenes en el eje antero-posterior de planos coronales del cerebro. La separación entre planos es de 0.1 mm. Se selecciona para el análisis el plano coronal correspondiente a -1.58 mm de bregma.

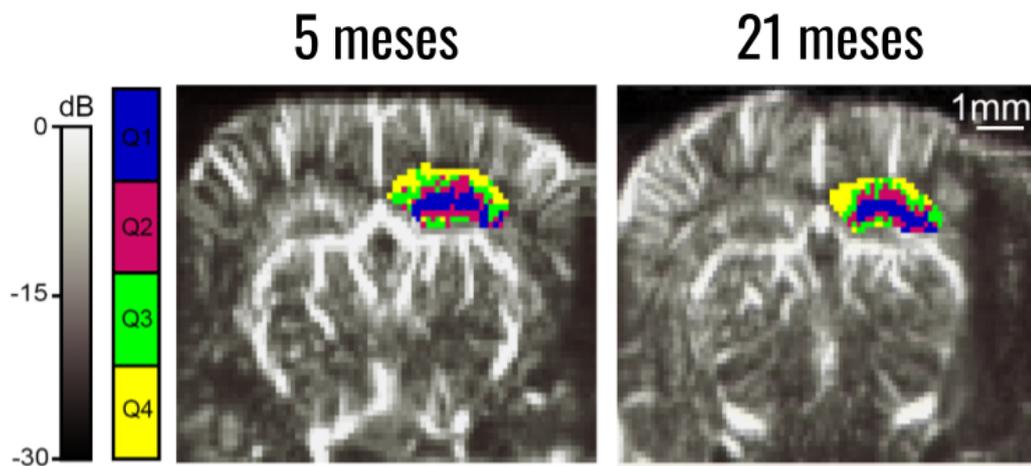
de la técnica. La SNR se calculó de la forma:

$$SNR = \frac{\bar{S}_{sangre}}{\bar{S}_{ruido/tejido}} \quad (4.1)$$

donde  $\bar{S}_{sangre}$  corresponde a la señal de sangre promedio para una región de interés (ROI) seleccionada dentro del hipocampo conteniendo al menos 1 vaso, y  $\bar{S}_{ruido/tejido}$  es la señal promedio asociada a ruido y movimiento de tejido a partir de una nueva ROI fuera del hipocampo donde no hubieran vasos visibles. El tamaño de las ROI's es de  $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$  y la ubicación fue aproximadamente la misma para todos los ratones. La ROI correspondiente a la sangre la ubicamos en la fisura inter-hemisférica, mientras que la ROI correspondiente a ruido la elegimos dentro del ventrículo central donde no se espera obtener señal Doppler debido a la ausencia de vasos. Los valores de corte promedios y la desviación estándar que obtuvimos para todos los ratones fueron:  $N_{tejido} = 30 \pm 11$  y  $N_{ruido} = 78 \pm 14$ . La baja variación en los valores de corte indica que las condiciones de flujo y ruido son comparables para los distintos ratones.

Finalmente, para realizar la segmentación seleccionamos de forma manual la región ocupada por el hipocampo, comparándola visualmente con el atlas (Paxinos y Franklin, 2019). La región seleccionada dentro del hipocampo se transformó a una escala de decibels, de forma de que el máximo valor de la distribución de

píxeles se encuentre dentro de dicha región; asegurando una independencia entre individuos debido a la normalización propia para cada ratón. Luego, segmentamos la distribución de píxeles de la región en cuartiles y obtuvimos los valores de corte correspondientes (Q1-25 %, Q2-50 %, Q3-75 %, y Q4-100 %) (figura 4.3). En este caso Q4 corresponde al mínimo valor de intensidad encontrado dentro del hipocampo. Para cada ratón, realizamos este procedimiento para ambos hipocampos, tratándolos como independientes uno de otro.



**Figura 4.3:** A las imágenes Doppler, para 5 y 21 meses de edad, se les superpone la segmentación en cuartiles de la distribución de intensidad de los píxeles ubicados dentro del hipocampo derecho. Los píxeles en azul corresponde a los de mayor intensidad y los amarillos a los de menor intensidad. Para cada ratón se obtuvieron los valores de corte de los cuartiles para ambos hipocampos, tomándolos como medidas independientes.

La elección de utilizar cuartiles se debió a la capacidad de distinguir estructuras vasculares tomando dicha distribución. También se probó utilizando quintiles o deciles pero las distribuciones obtenidas no permitían caracterizar el flujo. Paralelamente, una posible clasificación de los vasos sanguíneos según su volumen, es dividirlos en las 4 categorías mencionadas al comienzo del capítulo. Por lo tanto, la decisión de utilizar cuartiles cobra más sentido una vez que se contrastan los resultados de Doppler con los de Microscopía Confocal como se verá más adelante. De todas formas no se descarta que otra segmentación pueda ser utilizada para caracterizar el flujo vascular.

## 4.2. Adquisición y procesamiento de imágenes por Microscopía confocal

Luego de adquirir las imágenes Doppler los ratones son sacrificados y el cerebro es extraído para posteriormente obtener las imágenes por microscopía confocal. El procedimiento seguido es el descrito en (Damian et al. 2021). Inmediatamente luego de extraer el cerebro, los colocamos en una inmersión de solución fijante de 4 % paraformaldeido (PFA) en buffer PHEM por 1 hora a 4°C, y posteriormente los almacenamos por 24 horas en una nueva solución de 4 % PFA. Luego de la fijación, colocamos los cerebros en un soporte de 4 % de agarosa en agua, y obtenemos secciones de 50 $\mu m$  de ancho en un vibrátomo Leica VT 1000S. Finalmente, almacenamos las rebanadas en PHEM a 4°C hasta ser utilizadas para el reconocimiento vascular. El procedimiento anterior se encuentra descrito en detalle en (Anzibar Fialho; Vázquez Alberdi; Martínez et al. 2022).

El almacenamiento lo hacemos en Isolectina IB4 fluorescente, la cual se aglutina con las células perivasculares marcando las paredes de los vasos. Las imágenes las adquirimos con un microscopio confocal de barrido láser (SLCM) Zeiss LSM 800 (Anzibar Fialho; Vázquez Alberdi; Martínez et al. 2022), que al irradiar la isolectina genera una emisión de color verde que permite identificar los vasos marcados. Las imágenes finales se componen de 10 planos adyacentes, con una distancia entre planos de 5 $\mu m$  y el tamaño del píxel es 0.56 $\mu m$ .

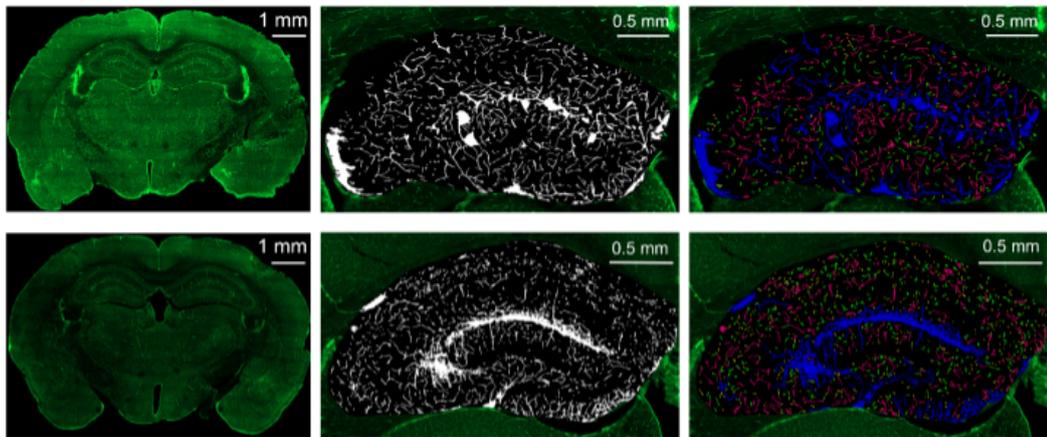
Para hacer el análisis de las imágenes utilizamos dos rodajas de cerebro adyacentes de 50 $\mu m$ , lo que corresponde a considerar una profundidad de 100 $\mu m$ . La intensidad fluorescente de las imágenes la analizamos con el software ImageJ, en donde cada hipocampo se puede seleccionar a partir del plano coronal. Transformamos la imagen de intensidad en una imagen binaria, utilizando una función de cota automática propia del software, que permite separar los vasos sanguíneos del ruido de fondo (figura 4.4). Finalmente, la imagen binaria la analizamos con un plug-in nativo del software denominado *3D Counter* que cuantifica los volúmenes vasculares; donde la profundidad de la imagen está dada por el apilamiento de planos. Como salida, el plug-in nos devuelve la distribución de volúmenes de los vasos encontrados en la región de interés, expresada como una lista detallando el volumen de cada vaso en  $\mu m^3$ .

Con el objetivo de normalizar los volúmenes para cada individuo, tomamos en cuenta el volumen total del hipocampo y computamos, para cada vaso encontrado,

la fracción de volumen del vaso o *Vessel Volume Fraction* (VVF):

$$VVF = \frac{\text{Volumen del vaso}}{\text{Volumen del hipocampo}} \times 1000 \quad (4.2)$$

donde el volumen del hipocampo lo calculamos al multiplicar el espesor de la imagen por el área de la superficie delimitada. La distribución de VVF fue dividida en 4 rangos en función de lo descrito por (Piechnik et al. 2008). De acuerdo a la capacidad de reserva sanguínea estos rangos son: arterias, venas, arteriolas y vénulas capilares. En función del VVF los rangos corresponden a: 0-0.0003 (azul), 0.0003-0.003 (rosa), 0.003-1 (verde), y >1 (amarillo) (ver panel derecho figura 4.4. Como resultado final, calculamos un único valor de VVF por rango, para cada hipocampo y para cada individuo, al promediar la distribución de 2 imágenes consecutivas.



**Figura 4.4:** En el panel superior se muestran las 3 etapas del procesamiento de las imágenes de microscopía confocal para los ratones de 5 meses. Dichas etapas corresponden a: obtener la imagen de intensidad de fluorescencia de IB4 del cerebro completo (izquierda), binarización de la imagen para separar los vasos del fondo (centro), segmentación en 4 rangos distintos según la capacidad de reserva vascular, divididos en arterias, venas, arteriolas y vénulas-capilares, con un color para cada rango (derecha). En color azul el rango correspondiente a 0-0.0003, en rosa el rango de 0.0003-0.003, en verde el rango 0.003-1 y en amarillo el rango >1. En el panel inferior se muestra de forma análoga el procedimiento para los ratones de 21 meses de edad.

### 4.3. Análisis estadístico

Para ambas modalidades tomamos un único valor para cada uno de los rangos, discriminando por hipocampo. Esto se debe a que a pesar de que existe una lateralización en el funcionamiento de ambos hemisferios a nivel del hipocampo, y que

funcionan de forma complementaria, (Benito et al. 2016)(Robinson et al. 2015), presentan diferencias a nivel de estructura vascular (Erdem et al. 1993)(Spallazzi et al. 2019).

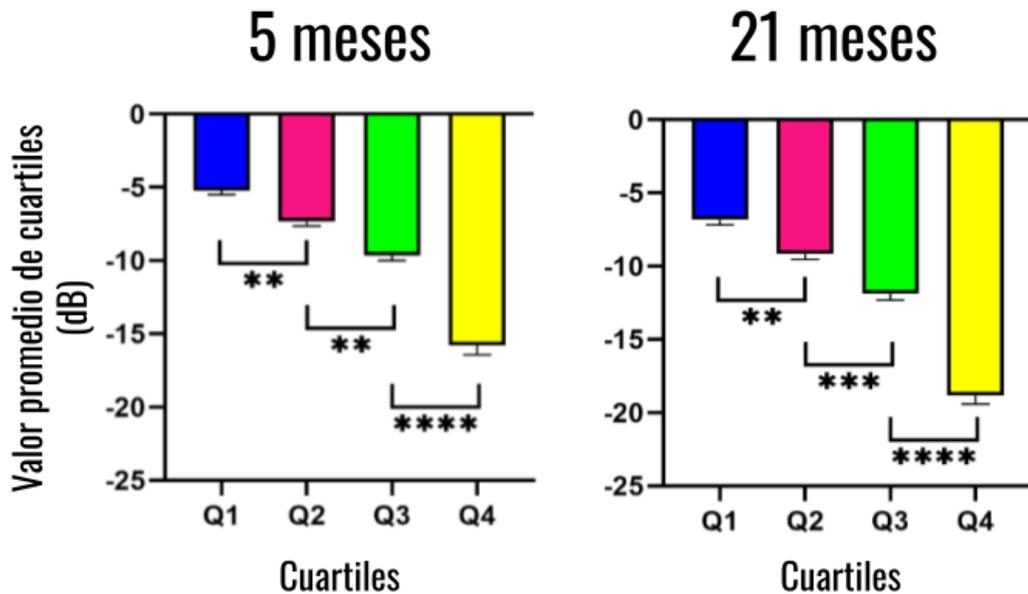
Para analizar si las distribuciones de valores (de cuartiles y rangos) siguen una distribución normal utilizamos el test de Shapiro-Wilk. Para evaluar las diferencias por edad, las distribuciones normales las comparamos utilizando el test-t de Student no pareado. Para las distribuciones no normales utilizamos el test de Mann-Whitney. Para evaluar las diferencias entre cuartiles para una misma edad, así como para los rangos de una misma edad en el caso de microscopía, aplicamos un test ANOVA de un solo factor. Realizamos también un test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Para el caso de las distribuciones no normales utilizamos el test de Friedman. En todos los test se utilizó un análisis de dos colas y el valor de alpha para considerar diferencias significativas fue de 0.05. En ningún caso descartamos valores espurios. El software que utilizamos para realizar el análisis estadístico fue GraphPad Prism 8 (GraphPad Prism, RRID:SCR002798).

## 4.4. Resultados y discusión

Centrándonos primero en el análisis de las imágenes Doppler, vemos que al comparar los valores de corte de los cuartiles para un mismo grupo etario encontramos diferencias significativas para cuartiles contiguos (figura 4.5). Esto indica que la segmentación en cuartiles de la distribución resulta efectiva a la hora de categorizar la perfusión sanguínea. Probamos otras posibilidades de segmentación (por ejemplo tomando deciles) pero concluimos que los cuartiles es la opción más eficiente en separar significativamente distintos rangos.

De forma análoga, evaluamos la segmentación en rangos de volúmenes aplicada a las imágenes de microscopía para cada grupo etario. Nuevamente podemos observar que para rangos contiguos existen diferencias significativas para todos ellos (figura 4.6).

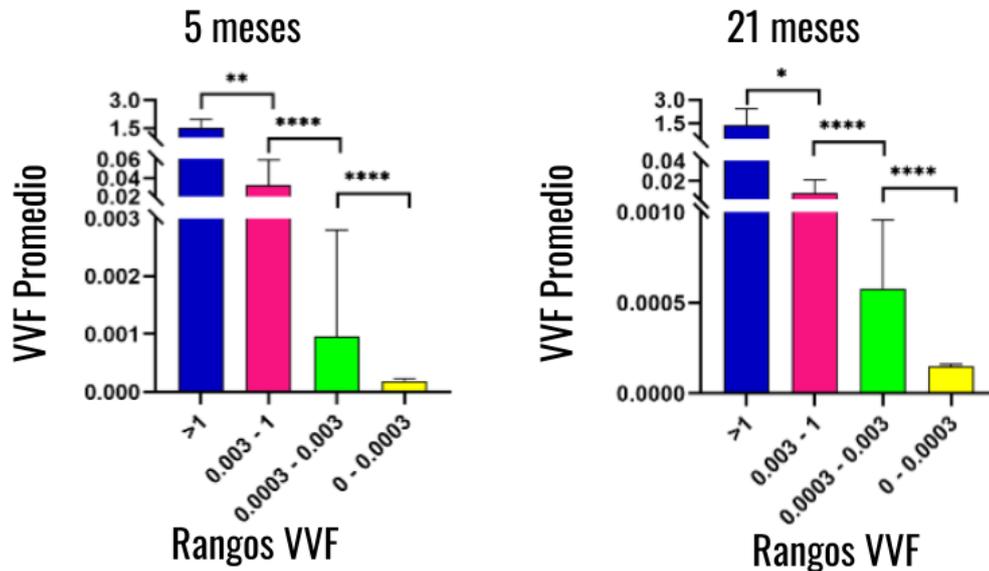
En la figura 4.7 presentamos una comparación visual de ambas modalidades para mostrar cómo las distintas regiones delimitadas por los cuartiles de CBV se pueden relacionar con las estructuras vasculares expuestas en las imágenes de microscopía. De esta forma, confirmamos que la separación en cuartiles es efectiva en caracterizar cualitativamente la funcionalidad de la red vascular hipocampal. Como se observa, las regiones de mayor intensidad de señal Doppler (Q1 y Q2) predominan en la región central. Esto lo podemos asociar a una estructura de gran tamaño



**Figura 4.5:** Para cada grupo etario (5 y 21 meses) se muestran los valores de corte promedio para cada uno de los cuartiles (Q1, Q2, Q3 y Q4). En todos los casos se encuentran diferencias significativas para los rangos contiguos. Para 5 meses: [Q1 vs Q2]: $p=0.0056$ , [Q2 vs Q3]: $p=0.0019$ , [Q3 vs Q4]: $p<0.0001$ . Para 21 meses: [Q1 vs Q2]: $p=0.0029$ , [Q2 vs Q3]: $p=0.0005$ , [Q3 vs Q4]: $p<0.0001$ . Se toma: \*\* $p<0.0021$ , \*\*\* $p<0.0002$  y \*\*\*\* $p<0.0001$ .

(VVF >1) que corresponde a la arteria ventral y la vena del surco cerebral (Tatu y Vuillier, 2014). Al momento de desarrollo actual, una comparación cuantitativa resulta compleja debido a la selección manual de los planos utilizados, y posibles diferencias en alineación o deformación al momento de tomar las imágenes (por ejemplo, al momento de extraer, fijar y cortar el cerebro). En nuestro caso, la selección se hizo basada en las estructuras vasculares observadas al comparar con el Atlas Paxinos y Franklin, 2019, y concluimos que corresponden a la misma región del hipocampo. Sin embargo, para poder llevar a cabo un análisis píxel a píxel (es decir, un estudio correlativo y no comparativo) se requeriría una mayor precisión en la alineación de ambas modalidades. Esto no se encuentra descrito en la bibliografía analizada y está por fuera de los objetivos del presente trabajo. En los últimos años se han venido desarrollando herramientas que podría posibilitar esta tarea (Nouhoum et al. 2021), y queda como posible trabajo futuro explorar esta implementación.

A partir de estos resultados, que respaldan la segmentación elegida para ambas modalidades, pasamos a realizar la comparación en edad. En la figura 4.8a observamos que a partir de la cuantificación de las imágenes Doppler existen diferencias significativas en todos los cuartiles ( $p \leq 0.002$ ). Lo que vemos es que para los

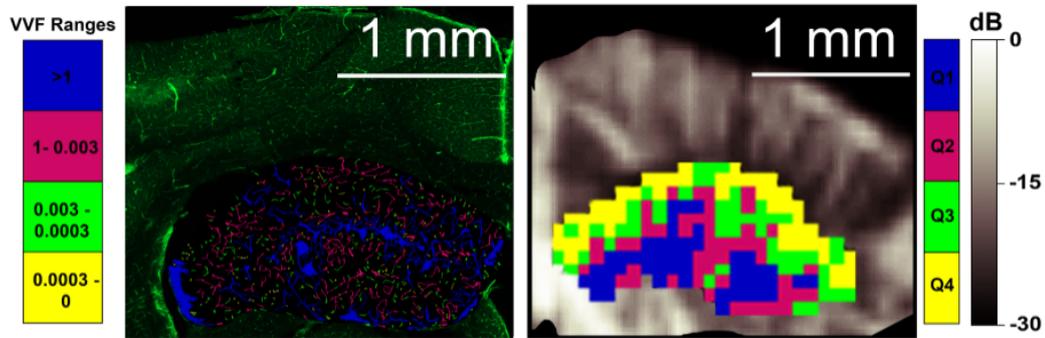


**Figura 4.6:** Para cada uno de los grupos etarios se muestra el VVF promedio para cada rango, calculado a partir de todos los hipocampos utilizados para el estudio. Para todos los rangos se encontraron diferencias significativas. Para 5 meses: [0–0.0003 vs. 0.0003–0.003] y [0.0003–0.003 vs. 0.003–1]: $p < 0.0001$ , [0.003–1 vs. >1]: $p = 0.0006$ . Para 21 meses: [0–0.0003 vs. 0.0003–0.003] y [0.0003–0.003 vs. 0.003–1]: $p < 0.0001$ , [0.003–1 vs. >1]: $p = 0.0440$ . Se toma: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.0021$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

ratones más jóvenes los valores de corte se dan a intensidades mayores, es decir que a medida que envejecen hay un decremento en el CBV. Para evaluar si este resultado no está afectado por otros factores, como diferencias de composición de los tejidos cerebrales, calculamos la atenuación del ultrasonido para ambos grupos, encontrando que no existen diferencias significativas ( $0.22 \pm 0.08 \text{ dB/cm}$  y  $0.21 \pm 0.06 \text{ dB/cm}$ , para jóvenes y viejos respectivamente). Para más detalles ver Anzibar Fialho; Vázquez Alberdi; Martínez et al. 2022.

Si comparamos los rangos establecidos para las imágenes de microscopía, nuevamente vemos que existen diferencias significativas en todos ellos respecto a la edad (figura 4.8b). En todos los rangos el valor medio de VVF disminuye con el envejecimiento. Esto indica un detrimento en la red vascular ocasionada por el aumento de edad. Esto es concordante con los resultados mencionados anteriormente respecto al decremento en el CBV.

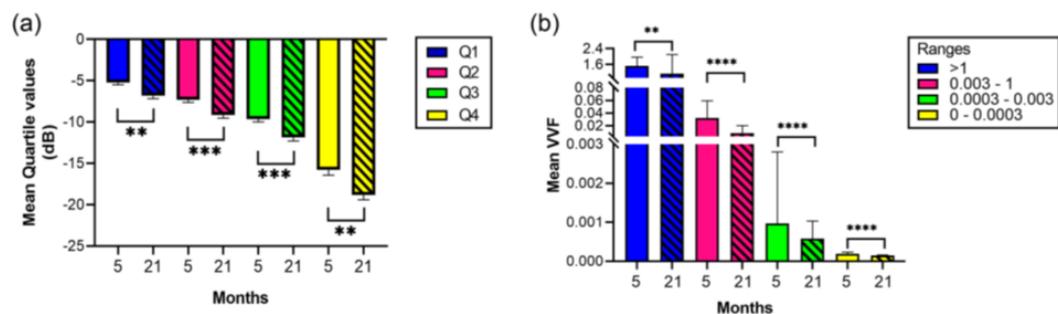
De esta forma, podemos confirmar que la segmentación en cuartiles elegida para las imágenes Doppler resulta suficientemente sensible para detectar cambios en la perfusión sanguínea debido al envejecimiento. Esto indica que la técnica permite cuantificar variaciones de la estructura vascular a escalas considerablemente meno-



**Figura 4.7:** En el panel de la izquierda se muestra una imagen de fluorescencia de IB4 a la que se superpone la distribución de vasos en los distintos rangos. Sobre el panel de la derecha se muestra una porción de imagen Doppler correspondiente al hipocampo a la cual se superpone la distribución de píxeles según el cuartil al que pertenezcan. Cualitativamente, los píxeles de mayor intensidad en la imagen Doppler (azules) corresponden a la estructura central del hipocampo que se aprecia en la imagen de microscopía. Dicha estructura corresponde a la vena del surco y la arteria ventral.

res a la resolución espacial del ultrasonido. En definitiva, la segmentación elegida resulta robusta y eficiente para estudiar alteraciones en la vasculatura, y permite replicar la metodología para evaluar cambios debido a otros factores fisiológicos como en el caso de enfermedades neurodegenerativas. En este sentido, existen antecedentes donde se utiliza el Doppler ultrarrápido para estudiar la vasculatura cerebral en ratones (H.-C. Li et al. 2019), en este caso utilizando una sonda de 40MHz lo cual permite una mayor resolución espacial. En dicho trabajo se describen variaciones en la densidad vascular (similar a lo propuesto con el VVF) a nivel del hipocampo, sin embargo la diferencia de edad entre grupos es menor a la utilizada en nuestro caso y no se logran encontrar diferencias significativas. En nuestro caso la utilización de una sonda de 15MHz nos permite tener una mayor profundidad de penetración en comparación al trabajo de H.-C. Li et al. 2019, pudiendo observar todo el cerebro y extender la cuantificación a otras regiones o estructuras de interés.

Otra de las técnicas utilizadas para estudiar los efectos del envejecimiento en la vasculatura cerebral de ratones ha sido la denominada *Ultrasound Localization Microscopy* (ULM). Esta técnica permite resolver vasos de aproximadamente  $9\mu m$  de diámetro y una separación de  $17\mu m$  (Errico et al. 2015). En el trabajo de Lowerison et al. 2022 se compara la microvasculatura en ratones de 7 y 27 meses de edad. A nivel del hipocampo se encuentra un decremento en la velocidad sanguínea y un aumento en la tortuosidad vascular con la edad. Sin embargo no se encuentran cambios en volumen de sangre, el cual se define de forma similar al VVF utilizado



**Figura 4.8:** (A) Valores medios de los cuartiles comparando por edad. En todos los cuartiles el valor medio es superior para los ratones de 5 meses, con diferencias significativas en todos los casos. [Q1]: $p=0.0019$ , [Q2]: $p=0.0008$ , [Q3]: $p=0.0005$ , [Q4]: $p=0.0020$ . (B) Comparación por edad de los valores medios de VVF para cada rango. [ $>1$ ]: $p=0.0023$ , [ $0.003-1$ ] y [ $0.0003-0.003$ ] y [ $0-0.0003$ ]: $p<0.0001$ . Se toma: \*\* $p<0.0021$ , \*\*\* $p<0.0002$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ .

en nuestro trabajo. Dado que los ratones más viejos tienen el mismo volumen pero menor velocidad, esto indicaría un decremento en el flujo sanguíneo, y por lo tanto se podría esperar un menor CBV, lo cual es concordante con nuestros resultados.

Algunos de los principales méritos de este trabajo combinado son: 1) la posibilidad de comparar una técnica In-vivo (es decir con el animal vivo) con una técnica Ex-vivo (luego de que el animal murió), 2) validar resultados a escalas espaciales distintas (100 veces más resolución en microscopía que en Doppler), y 3) relacionar la estructura de la red vascular con el flujo de sangre medido.

Por otro lado, el aspecto negativo de la metodología utilizada en este trabajo es la necesidad de realizar una intervención quirúrgica para permitir el pasaje de ultrasonido. Estos procedimientos invasivos no son deseables ya que pueden afectar al cerebro en la etapa anterior a tomar las imágenes. En trabajos posteriores se debería buscar combinar la metodología propuesta en este trabajo con la adquisición de imágenes Doppler de forma transcranial a través de técnicas de contraste (Errico et al. 2016), de corrección de fase (Demene et al. 2021)(Soulioti et al. 2019) o de afinamiento de cráneo (Rahal et al. 2020).

Con respecto a la separación en rangos de las imágenes de microscopía confocal, esta herramienta nos permitió detectar el impacto del envejecimiento en la red vascular. Los resultados para el VVF total computado en el hipocampo, indican que no hay diferencias por edad (ver Anzibar Fialho; Vázquez Alberdi; Martínez et al. 2022). Esto muestra que la capacidad de reserva total de la red vascular no varía pero si su distribución en los rangos. También se calculó la cantidad total de vasos

encontrados en cada grupo, encontrando en este caso diferencias significativas, donde los ratones más viejos tienen mayor cantidad de vasos. Si evaluamos por rango y por edad, encontramos que la principal diferencia en la relación volumen/cantidad de vasos se da a nivel capilar. Esto resulta de relevancia ya que los vasos capilares son parte central de la unión neurovascular y se asocian a la fisiología respiratoria. Estos resultados son consistentes con estudios histológicos que indican un deterioro de la microvasculatura asociado a la edad (Desjardins et al. [2014](#)).

La conjunción de ambas técnicas permite un entendimiento más profundo de las implicancias del envejecimiento en el desarrollo neurovascular. La metodología desarrollada posibilitó establecer una asociación entre dos técnicas a priori muy distintas, tanto a nivel de escala espacial y magnitud física medida, así como su aplicación antemortem y postmortem. El enfoque multidisciplinario del trabajo, en el que destacan la relevancia de estudiar los procesos fisiológicos de forma integral, y el desarrollo de un método original de análisis de las imágenes Doppler, contribuyeron a la publicación del trabajo Anzibar Fialho; Vázquez Alberdi; Martínez et al. [2022](#).

## Capítulo 5

# Determinación de redes cerebrales mediante ultrasonido funcional: aplicación a la enfermedad neurodegenerativa Charcot-Marie-Tooth

En este capítulo se implementa el ultrasonido funcional (fUS) para establecer redes funcionales del cerebro (RFC) en ratones. Las RFC obtenidas del fUS, son representaciones topológicas de los patrones espacio-temporales que se observan debido a los cambios en el volumen de sangre (CBV) asociados a la actividad neurológica del cerebro. Estas redes, varían su forma en relación a vínculos funcionales entre las regiones, durante tareas o funciones específicas que realiza el cerebro. De esta forma, cada función cerebral posee una RFC característica, que contempla todos los vínculos funcionales que existen entre las regiones del cerebro especializadas en dicha función. Decir que dos regiones están vinculadas o conectadas funcionalmente, corresponde a afirmar que el flujo vascular, que alimenta las neuronas de dichas regiones, varía de forma (cuasi) sincronizada entre ambas regiones. Es en este sentido, que las RFC son representaciones topológicas de todas las conexiones que se generan para un estado funcional específico.

Por lo tanto, construimos las RFC a partir de analizar la correlación de la actividad neurológica entre distintas regiones del cerebro. Estas regiones son definidas a partir de una referencia anatómica dada por el Atlas Paxinos y Franklin, [2019](#). Cada

una de estas regiones corresponde a un nodo de la red y los enlaces están dados por la magnitud de la correlación. Estudiaremos las RFC para dos estados: 1) donde el animal se encuentra bajo una tarea somatosensorial específica, y 2) mientras está en reposo, que corresponde a la actividad espontánea al estar sedado y en ausencia de estímulos sensoriales específicos. En la sección 5.1 se describe la metodología específica para el análisis de las imágenes y el post procesamiento de los datos para obtener las RFC.

El objetivo final de este capítulo es estudiar las RFC para un modelo de la enfermedad neurodegenerativa Charcot-Marie-Tooth. Esta enfermedad es la principal neuropatía periférica hereditaria en humanos (ver sección 1.4). El modelo de ratón utilizado es denominado Trembler-J (TrJ), y posee una mutación espontánea análoga a la observada en humanos. Estudios recientes sobre este modelo han revelado una incidencia de dicha enfermedad a nivel del sistema nervioso central y no solamente periférico (ver sección 1.4). Por lo tanto, un análisis a partir de RFC puede servir como herramienta para aportar nuevas perspectivas al entendimiento de dicha enfermedad.

Para alcanzar dicho objetivo, en primer lugar nos restringimos a estudiar un único nodo de la red, en nuestro caso correspondiente a la región anatómica de la corteza somatosensorial primaria (S1BF). En los ratones, dicha región se corresponde funcionalmente con el control sensoriomotor de las vibrisas. De esta forma estudiamos la respuesta neurovascular de S1BF frente a un estímulo sensorial específico, correspondiente al movimiento de las vibrisas. El objetivo de esta parte es caracterizar la activación de dicha región y comparar el modelo TrJ con el modelo de ratones sanos WildType (WT) (sección 5.2.1).

En segundo lugar, queremos evaluar cómo se relaciona la región S1BF con el resto del cerebro, y a la vez, entender qué otras regiones del cerebro están involucradas en la función sensoriomotora de las vibrisas. Para ello, estudiamos las RFC emergentes en ambos modelos al aplicar el estímulo sensorial. A partir de estas redes emergentes, analizaremos las diferencias de conectividad para ratones TrJ y ratones WildType (sección 5.2.2).

Finalmente, estudiamos la conectividad para las mismas regiones, en ambos modelos, pero en ausencia de estímulos externos, es decir, en reposo. Comparando las redes emergentes bajo esta condición, evaluamos las diferencias entre los dos grupos de ratones (sección 5.2.2). Adicionalmente, comparamos las RFC asociadas al reposo para cada modelo de ratón con la RFC asociada al estímulo sensorial, analizando como cambian las conexiones funcionales en cada caso (sección 5.2.2).

## **5.1. Materiales y métodos empleados en Ultrasonido Funcional**

### **5.1.1. Procedimiento experimental animal**

Para esta sección utilizamos ratones machos WildType (WT) y Trembler-J (TrJ) de entre 2 y 3 meses, que fueron criados en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) bajo condiciones ambientales controladas (ver la sección 4.1 para más detalles). Todos los procedimientos los realizamos acorde a la ley 18611, bajo el protocolo aprobado 002a/10/2020 en el IIBCE. Utilizamos ratones de dicha edad ya que el grosor del cráneo es suficientemente fino como para permitir el pasaje de las ondas de sonido, evitando así realizar una ventana craneal para tomar las imágenes. En trabajos similares, como el de Ferrier et al. 2020, la edad utilizada es la misma que en nuestro experimento.

Para obtener las imágenes, anestesiarnos los ratones con 120mg/kg de ketamina (Vetanarcol, König) y 16 mg/kg de xylazina (Xylased\*2, Vetcross) en una solución salina para un volumen final de 300  $\mu$ l. En una primera instancia administramos aproximadamente 3/5 de la dosis total y aguardamos 10 minutos hasta que el animal quedó dormido por completo. En dicho momento colocamos una crema depilatoria sobre el cráneo para eliminar el pelo. Luego de otros 10 minutos, removimos la crema para dejar al descubierto la piel que recubre el cráneo. Inmediatamente después, lo colocamos en el sistema estereotáxico para alinear la sonda (ver sección 3.1 para más detalles). Una vez alcanzado el plano deseado adquirimos las imágenes Doppler. El resto de la anestesia la administramos en función del estado de somnolencia del animal a partir de monitorearlo visualmente.

### **5.1.2. Adquisición y filtrado de imágenes**

La secuencia de adquisición de imágenes es la misma que se describe en la sección 3.1, que nos permite obtener un muestreo temporal de 1 imagen por segundo. En este caso, como el interés es observar el comportamiento de la corteza y el hipocampo, redujimos la profundidad de la región muestreada a la mitad, teniendo de esta forma una imagen de  $128 \times 41$  píxeles, que equivale a una región de  $(12,8 \times 4,1)$  mm . Esto nos permitió centrarnos en la región deseada y evitar la presencia de artefactos en la región inferior del plano coronal que puedan afectar a la imagen en su conjunto. Durante la adquisición de las imágenes, controlamos la temperatura de

forma continua ya que resulta un parámetro clave para obtener una buena respuesta funcional. La temperatura óptima para observar la respuesta se encuentra entre  $37^{\circ}C$  y  $38^{\circ}C$ . Por debajo de dicho rango no observamos respuesta al estímulo en ningún caso. Temperaturas por encima de  $38^{\circ}C$  pueden comprometer la fisiología del animal.

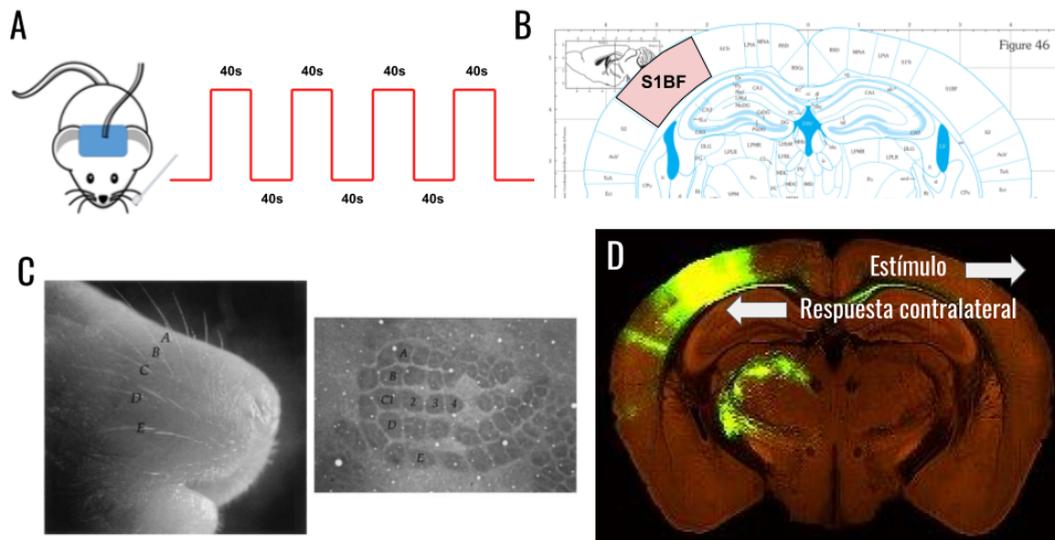
En una primera instancia, tomamos imágenes mientras el ratón se encontraba en estado de *reposo*. Esto consistió en adquirir por un periodo de 380 segundos en donde controlamos visualmente que no haya ningún movimiento por parte del ratón. Este experimento lo podemos considerar como un estado neurológico en donde el individuo no está centrando su actividad cerebral en una tarea sensorial específica, sino que corresponde a estados internos del funcionamiento neuro-vascular. En contraposición a esto, un segundo experimento, que denominamos *estímulo*, consistió en adquirir imágenes por 380 segundos mientras aplicábamos un patrón de estímulos periódicos de la vía de las vibrisas. Esto consistió en intercalar 40 segundos donde el ratón está en reposo y 40 segundos donde frotábamos de forma manual las vibrisas con la ayuda de un cotonete (ver figura 5.1A).

### 5.1.3. Vía de las vibrisas en ratones

En los ratones, las vibrisas sirven como detectores altamente sensibles que permiten, a través del tacto, crear una representación espacial de su entorno. Para explorar el medio, los roedores controlan la actividad motora de sus vibrisas a través de movimientos rápidos y rítmicos que les permiten localizar objetos y discriminar texturas (Erzurumlu y Gaspar, 2012)(Petersen, 2007). El sistema sensorial de los vibrisas está altamente especializado en el cerebro en una región denominada campo de barriles perteneciente a la corteza somatosensorial primaria (en inglés *primary somatosensory cortex barrel field*) abreviada como S1BF. En la figura 5.1B se muestra la ubicación de esta región en una imagen coronal del cerebro extraída del atlas Paxinos y Franklin, 2019. En esta región las vibrisas tienen una representación somatotópica, es decir que cada bigote corresponde a conjunto de neuronas o estructura nerviosa bien definida denominada barril (figura 5.1C). Esta distribución anatómica se completa a los pocos días de nacimiento y queda fija a lo largo de todo el desarrollo, por lo tanto sirve como excelente modelo para estudiar variaciones fisiológicas causadas por un funcionamiento anormal.

La vía de las vibrisas comienza con la excitación de neuronas sensoriales que inervan cada uno de ellos y transmiten el impulso eléctrico a través del nervio tri-

gémino hasta el tronco encefálico. De allí se envía información sensorial al tálamo, que finalmente proyecta a la corteza primaria (S1BF) contralateral a donde se dio el movimiento de las vibrisas. Es decir que la vía decusa y la respuesta cortical se debe esperar del lado contrario a donde se estimuló. En la figura 5.1D se muestra la activación de la S1BF a partir de una técnica de recombinación genética.



**Figura 5.1:** (A) Los ratones son estimulados en las vibrisas con un patrón periódico de alternancia encendido-apagado de 40 segundos. (B) Plano coronal extraído de (Dong, 2008) donde se muestra la ubicación de la corteza somatosensorial primaria izquierda. (C) Cada bigote tiene asociado una estructura específica en la corteza somatosensorial primaria, lo que se conoce como campo de barriles. Extraído de (Wilson et al. 2000). (D) Activación de la corteza somatosensorial primaria a través de la técnica de rAAV, extraído de <https://connectivity.brain-map.org/>.

Para localizar esta región en las imágenes Doppler, alineamos la sonda de forma visual intentando reconocer estructuras claves. Utilizamos al hipocampo como referencia, ya que varía su forma a medida que nos movemos en el eje antero-posterior, permitiendo así ubicar los planos coronales que comprenden a S1BF. Una vez encontrado el plano deseado, procedimos a adquirir las imágenes para los estados de reposo y estímulo.

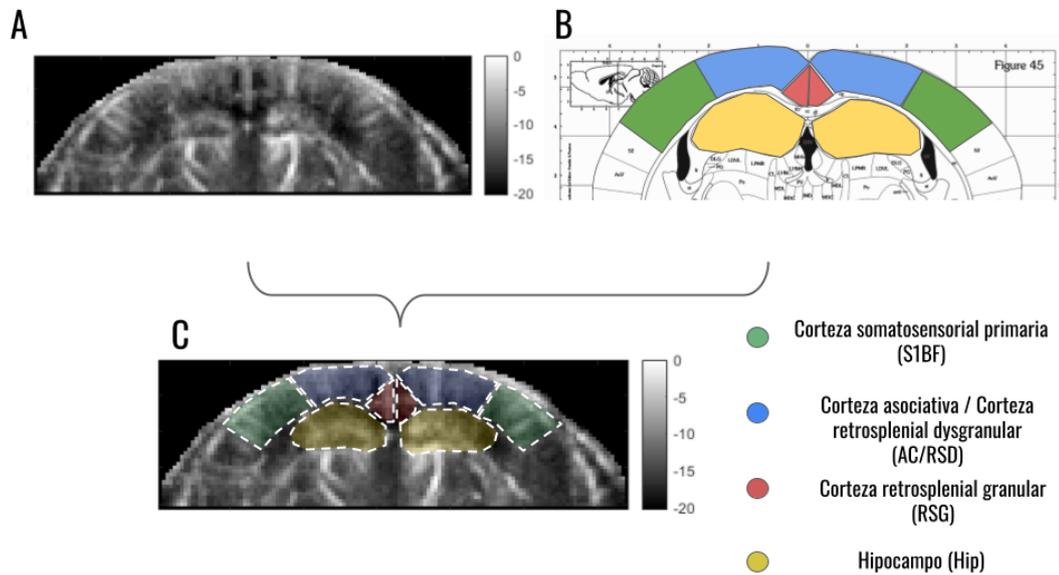
#### 5.1.4. Procesamiento y seccionamiento de la imagen

Para el procesamiento de las imágenes, generamos una máscara para eliminar la información que se encuentra por fuera del cerebro. Esto lo realizamos manualmente delimitando el contorno del cráneo de forma visual. Luego aplicamos el filtro

de descomposición en valores singulares (SVD), que separa la imagen en distintos subespacios independientes, que permiten discriminar la señal de flujo sanguíneo, eliminando los movimientos de tejido y ruido propio de la técnica (ver sección 3.2 para más detalles). Para determinar el subespacio asociado al flujo sanguíneo, utilizamos valores fijos de corte, siendo 35 para el tejido y 200 para el ruido. En este caso no realizamos un análisis en función de la relación señal-ruido como en la sección 4.1, ya que el costo computacional era muy elevado en relación a la poca pérdida de información al tomar valores fijos. Las imágenes que obtuvimos son como la que se muestran en la figura 5.2A.

El siguiente paso consistió en seccionar las imágenes Doppler en distintas regiones anatómicas de interés. Esto lo hicimos tomando como referencia el Atlas Paxinos y Franklin, 2019. Este define la forma y locación de las regiones del cerebro en un espacio de coordenadas común, para distintas secciones o planos coronales y sagitales. En base a seleccionar los planos coronales del atlas que mejor se ajusta a las estructuras observadas en la imagen Doppler, los planos que consideramos fueron 44 (Bregma -1.58mm), 45 (Bregma -1.70mm) y 46 (Bregma -1.82mm). De esta forma, superpusimos cada imagen Doppler (figura 5.2A) a la imagen del Atlas (figura 5.2B) para hacer coincidir las estructuras y poder definir las regiones anatómicas de interés (figura 5.2C).

En este caso, seleccionamos 8 regiones distintas, siendo 4 análogas entre hemisferios. Las regiones en verde en la figura 5.2B y 5.2C corresponde a la *corteza somatosensorial primaria* (S1BF), en donde se encuentra el campo de barriles encargado del control sensitivo-motor de las vibrisas. En azul, delimitamos las regiones de la *corteza asociativa* (AC, por sus siglas en inglés) y la *corteza retrosplenial disgranular* (RSD). La corteza asociativa en roedores tiene una función integrativa y participa en procesos sensoriales y espaciales como la toma de decisiones y movimientos planeados (Ivashkina et al. 2019). La corteza retrosplenial se involucra en procesos de aprendizaje espacial o de navegación, y se puede dividir en dos importantes regiones funcionales: la disgranular, asociada a procesos de aprendizaje espaciales externos, y la *corteza retrosplenial granular* (RSG, en rojo en la figura 5.2B y 5.2C), asociada al aprendizaje a través de factores tanto externos como internos (Pothuizen et al. 2009). Estudios recientes sugieren que esta última región puede ser un área importante en procesos internos del cerebro siendo parte clave de una posible red cerebral por defecto en ratones (Ferrier et al. 2020). Debido a que en dicho trabajo las regiones AC (divididas en lateral y medial) y RSD muestran un comportamiento funcional conjunto, decidimos agruparlas en una única región. Por



**Figura 5.2:** (A) Imagen Doppler del plano coronal de un ratón WildType. (B) A partir del Atlas (Paxinos y Franklin, 2019) se seleccionan 8 regiones anatómicas de interés para estudiar. (C) Superponiendo la imagen del Atlas a la imagen Doppler se dibujan de forma manual las regiones anatómicas para delimitar las áreas correspondientes en la imagen Doppler.

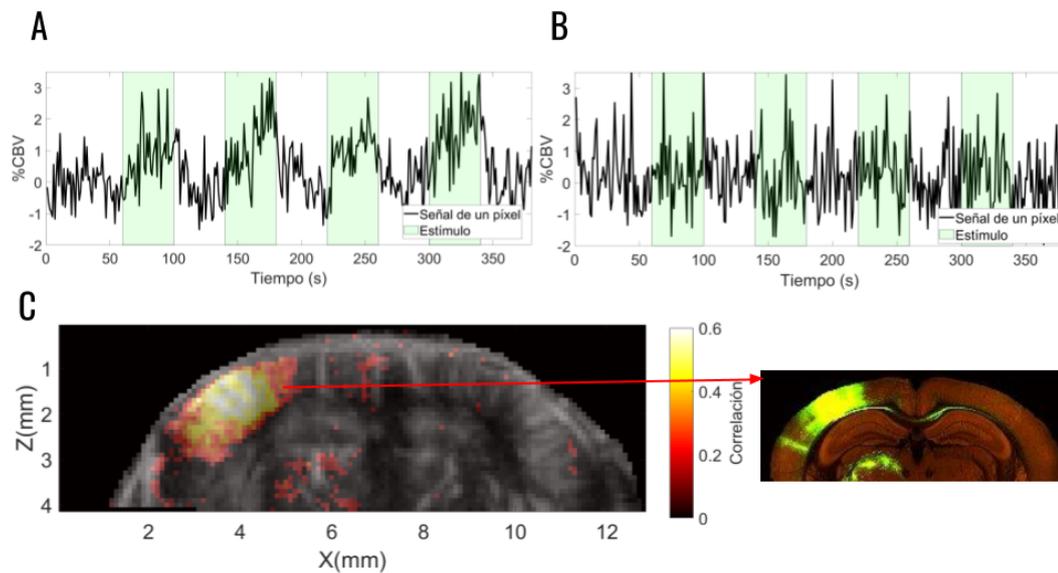
último, delimitamos la región que comprende al *hipocampo* para cada uno de los hemisferios (región amarilla en la figura 5.2B y 5.2C). Esta estructura anatómica tiene como funciones principales el procesamiento de información multisensorial y su codificación en memoria de largo plazo (Zemla y Basu, 2017), así como una singular capacidad neurogénica (Eriksson et al. 1998)(Moreno-Jiménez et al. 2019).

### 5.1.5. Mapas de activación

Para analizar cómo responde el cerebro al estímulo, debemos evaluar cómo es la señal temporal de los distintos píxeles de la imagen. El primer paso fue expresar la amplitud de la señal temporal en una magnitud que sea comparable para todos los ratones, en este caso, utilizamos la medida de variación porcentual de CBV ( $\%CBV$ ). Para cada píxel calculamos un valor basal de señal que corresponde a la amplitud de intensidad promedio durante los primeros 20 segundos de datos ( $CBV_{BASAL}$ ), donde el ratón está sin ningún estímulo externo específico y sedado. Luego utilizamos este valor como referencia para expresar la variación relativa en la amplitud de la señal temporal de dicho píxel. Por lo tanto, para cada dato de dicha señal temporal, la amplitud de la variación en CBV se calcula como:

$$\%CBV = 100 \times \left( \frac{CBV - CBV_{BASAL}}{CBV_{BASAL}} \right) \quad (5.1)$$

El siguiente paso fue evaluar qué región del cerebro se activa al momento de aplicar el estímulo específico. Para ello realizamos la correlación cruzada de la señal temporal de cada píxel con el patrón de estímulo, obteniendo un valor de correlación para cada punto. Una señal como la que se observa en la figura 5.3A tendrá un alto valor de correlación, mientras que una señal como la observada en la figura 5.3B tendrá un valor de correlación bajo.



**Figura 5.3:** (A) Señal temporal altamente correlacionada con el patrón de estímulo (franjitas verdes), correspondiente a un píxel de la región S1BF. (B) Señal temporal no correlacionada con el patrón de estímulo correspondiente a un píxel fuera de la región S1BF. (C) Mapa de activación superpuesto a la imagen Doppler. En escala de color se indica el valor de correlación de la señal temporal de cada píxel con el patrón de estímulo aplicado. Los píxeles con un *p*-valor mayor a 0.01 son descartados. El área activada se corresponde con lo descrito mediante técnicas de histología.

Aplicando este procedimiento para todos los píxeles construimos el *mapa de activación* que se observa en la figura 5.3C, donde la escala de colores corresponde al valor de correlación. Únicamente se consideraron los píxeles con correlación significativa, definiendo como significativa la correlación que tienen un *p*-valor menor a 0.01. Es decir, consideramos aquellas correlaciones que no pueden asociarse a un caso aleatorio. Como se observa en la figura 5.3C el área que contiene los píxeles de correlación significativa se corresponde con la activación de la corteza somatosensorial primaria observada mediante otras técnicas.

### 5.1.6. Análisis de la región S1BF

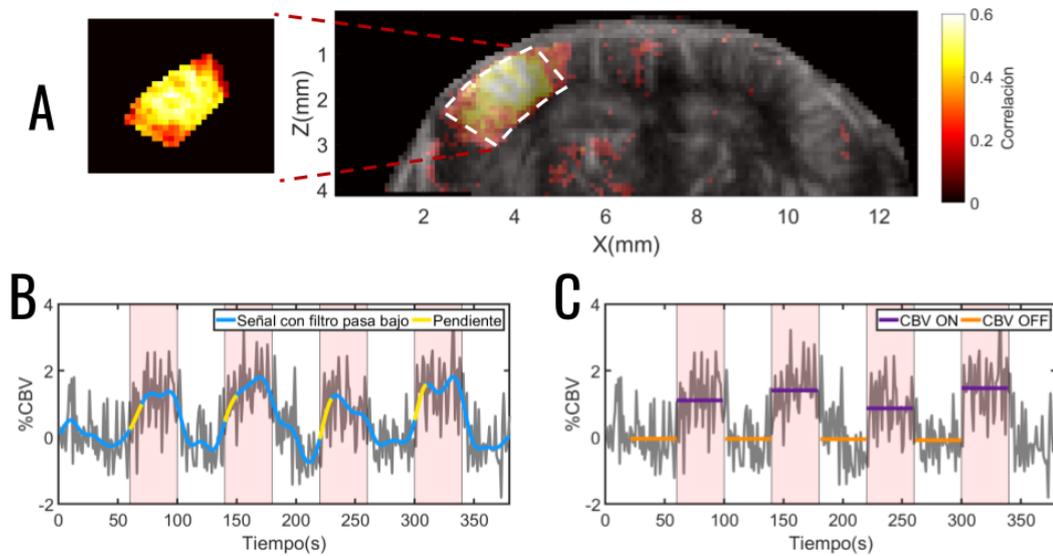
Para estudiar si existe una respuesta sensorial diferenciada entre los genotipos WildType y Trembler, analizamos la región S1BF contralateral a donde se aplicó el estímulo, que es donde se espera observar la activación. En particular nos centramos en analizar dos características: 1) cómo es la respuesta a nivel espacial, en cuanto al área de activación y valor de correlación, y 2) cómo es la evolución temporal de la respuesta, en relación a la tasa de variación de CBV en cada estímulo y la amplitud de la señal en cada estímulo.

Para responder a la primera interrogante, nos acotamos a los píxeles de la región S1BF. En la figura 5.4A se muestra un ratón WildType representativo donde se observa como gran parte de la región se encuentra activada, es decir, conteniendo píxeles con correlación significativa. Calculamos la cantidad de píxeles totales en la región, lo cual llamamos área total de S1BF, y calculamos la cantidad de píxeles con correlación significativa dentro de dicha región, lo que llamamos área de activación. En base a estas dos cantidades, calculamos el porcentaje de activación como el cociente entre área de activación y área total de S1BF.

Para estudiar si existen diferencias en el valor de correlación entre genotipos, tomamos para cada ratón la distribución de valores de correlación de la región de activación. Para cada distribución calculamos un único valor representativo, tomado como el promedio de los datos.

Para responder a la segunda interrogante y poder estudiar la tasa de respuesta al estímulo, decidimos evaluar la pendiente de la señal en los segundos posteriores a que el estímulo comienza a aplicarse. Esto nos da una medida de cuál es la tasa de incremento de la perfusión sanguínea en función del tiempo. Para cada píxel del área de activación consideramos la señal temporal y aplicamos un filtro pasa bajo con frecuencia de corte 0.01 Hz como se observa en la figura 5.4B. A partir de la señal filtrada, tomamos los siguientes 6 puntos luego de iniciar un estímulo (correspondientes a 6 segundos) considerándolos como la curva de activación para cada estímulo (segmento en amarillo figura 5.4B). Luego calculamos mediante un ajuste lineal, la pendiente para cada uno de los cuatro estímulos. De esta forma, para cada píxel activado dentro de la región S1BF tenemos 4 valores de pendientes correspondientes a cada uno de los estímulos.

Considerando ahora todos los píxeles activados tenemos entonces una distribución de pendientes para cada uno de los 4 estímulos en cada ratón. Para cada una de estas distribuciones calculamos el promedio como valor representativo. De esta for-



**Figura 5.4:** (A) Para cada ratón se consideran únicamente los píxeles con correlación significativa dentro de la región S1BF (delimitada por la línea blanca discontinua). Se define como significativa aquella correlación con un  $p$ -valor menor a 0.01. (B) Se muestra la señal temporal de un único píxel (línea gris) en la región de activación. Filtramos la señal con un filtro pasa bajo de 0.01 Hz (línea azul). A partir de la señal filtrada, tomamos los primeros 6 puntos luego de aplicar un estímulo, y los consideramos como la curva de activación (línea en amarillo). Para cada curva de activación se realiza un ajuste lineal y se obtiene un valor de pendiente. (C) Para la señal temporal de un píxel en la región de activación (línea gris) se calcula el valor promedio de %CBV durante el momento que se aplica el estímulo, el cual denominamos  $\%CBV_{ON}$ , y el valor promedio de %CBV los 40 segundos previos a comenzar el estímulo, el cual denominamos  $\%CBV_{OFF}$ . Luego, se utilizarán estos valores para calcular la diferencia de amplitud  $\%CBV_{ON} - \%CBV_{OFF}$  para cada instancia de estímulo.

ma tenemos un valor de pendiente por estímulo por ratón. En base a esto, evaluamos si existen diferencias en los valores de pendiente entre: 1) genotipos al considerar todos los estímulos, 2) genotipo en cada uno de los estímulos y 3) estímulos para un mismo genotipo.

Finalmente, evaluamos cómo es la amplitud de la señal en los momentos que estimulamos en relación a los momentos donde no se estimula. Es decir, estudiamos la diferencia en la variación de perfusión sanguínea entre la activación y el estado basal. Para ello consideramos los píxeles del área de activación y calculamos, para cada señal temporal de dichos píxeles, un valor promedio de %CBV para cada uno de los 4 intervalos de estímulo, denominados  $\%CBV_{ON}$ . También calculamos un valor promedio de %CBV para los 40 segundos previos a comenzar cada estímulo, el cual denominamos  $\%CBV_{OFF}$  (figura 5.4C). Por lo tanto, la diferencia en

amplitud de la señal en cada estímulo estará dada por  $\%CBV_{ON} - \%CBV_{OFF}$ . Realizamos un análisis comparativo entre genotipos para cada estímulo y también considerando un valor global de activación calculado como el promedio de todos los intervalos de estímulo. A su vez con esta metodología podemos comparar cómo evoluciona el cambio de amplitud a medida que aplicamos nuevos estímulos a un mismo genotipo.

### **5.1.7. Análisis de las redes funcionales del cerebro**

El segundo análisis funcional correspondió a estudiar la conectividad del cerebro para los genotipos WT y TrJ a partir de las RFC, en los estados de reposo y de estímulo. Considerando las 8 regiones anatómicas delimitadas a partir del atlas (figura 5.5A), obtuvimos una señal temporal representativa (figura 5.5B), calculada como el promedio espacial de la señal temporal de todos los píxeles de la región.

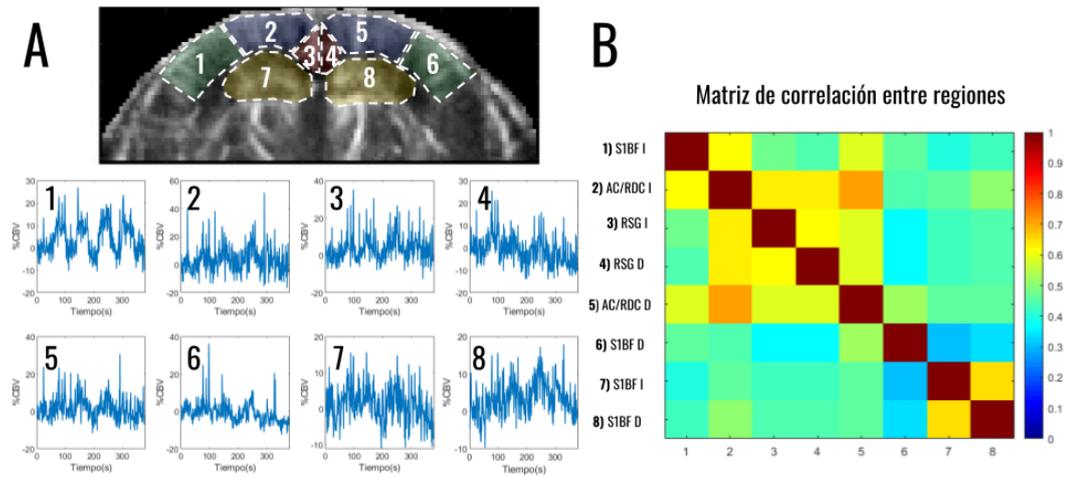
El siguiente paso consistió en correlacionar la señal de una región, por ejemplo la 1, con todas las demás, es decir, la 1 con la 2, la 1 con la 3, y así sucesivamente. Luego se toma una región distinta, por ejemplo la 2, y se calcula la correlación con las demás regiones. Para poder analizar de forma gráfica la correlación de todas las regiones del cerebro construimos la *matriz de correlación*, como se observa en la figura 5.5B, donde la entrada  $(i, j)$  indica el valor de correlación entre la señal de la región  $i$  y la región  $j$ . Esta matriz de correlación constituye la RFC del animal.

Para cada genotipo, construimos una matriz de correlación representativa para el experimento de *reposo* y para el experimento de *estímulo*. La matriz representativa la obtuvimos a partir de promediar el conjunto de matrices de los distintos ratones en cada estado.

### **5.1.8. Análisis estadístico**

#### **5.1.8.1. Análisis región S1BF**

Para evaluar el porcentaje de activación de la región S1BF, consideramos 10 ratones WT y 8 ratones TrJ, teniendo un único valor por cada ratón. Evaluamos la normalidad de las distribuciones de cada genotipo con el test de Shapiro-Wilk, resultando en ambos casos normales con un p-valor = 0.1145 y p-valor = 0.3607 para WT y TrJ respectivamente. Las diferencias entre distribuciones se evaluaron con un test no pareado t-Student.



**Figura 5.5:** (A) A partir de las 8 regiones anatómicas computamos una única señal representativa para cada región, correspondiente al promedio de las señales temporales de los píxeles en dicha región. (B) Correlacionamos la señal temporal de cada región contra las señales temporales de las restantes. Construimos la matriz de correlación, donde cada entrada corresponde al valor de correlación entre señales de las regiones indicadas por las coordenadas de la matriz  $(i, j)$ . Se muestra la matriz de correlación representativa para el genotipo WildType en el estado de estímulo.

Para analizar los datos de correlación consideramos la misma cantidad de ratones por genotipo (10 WT y 8 TrJ). Nuevamente se evaluó la normalidad con el test de Shapiro-Wilk y las diferencias entre genotipo a partir de un test no pareado t-Student. Los datos resultaron normales con un p-valor = 0.38685 y p-valor = 0.9810 para WT y TrJ respectivamente.

Para estudiar la pendiente, se tiene una distribución de 10 valores por estímulo en los WT y 8 valores por estímulo en TrJ. Para analizar la normalidad de cada distribución se utilizó el test de Shapiro-Wilk. Para analizar las diferencias entre genotipo para cada estímulo, en el caso de que dos distribuciones resultaran normales se compararon utilizando un test no pareado t-Student. En caso de que dos distribuciones resultaran no-normales se utilizó un test de Mann-Whitney para compararlas. Para analizar las diferencias entre estímulos para un mismo genotipo se utilizó un test ANOVA con comparaciones múltiples.

Finalmente, para evaluar la amplitud de la señal en los momentos donde se estimula en comparación a cuando no se estimula, se realizaron los test análogos a los usados para evaluar la pendiente. Nuevamente para evaluar las diferencias entre estímulos se utilizó un test ANOVA con comparaciones múltiples.

### **5.1.8.2. Análisis de las redes funcionales del cerebro**

Para el genotipo WT, se tiene una matriz representativa para el estado de reposo construida a partir del promedio de las matrices de los 6 ratones y una matriz para el estado de estímulo construido con la misma cantidad de animales. En el caso de los ratones TrJ, se obtienen las matrices representativas de igual manera pero obtenidas a partir de 6 animales para el estado de estímulo y 5 animales para el estado de reposo. Las entradas de cada una de estas matrices da una distribución de valores de correlación correspondientes a la cantidad de animales considerados en cada genotipo. Para estudiar la normalidad de estas distribuciones se aplicó el test de Shapiro-Wilk. Para comparar dos distribuciones se aplicó el test no pareado t-Student en el caso de que los datos resultaran normales, y el test de Mann-Whitney en el caso de que los datos no fueran normales. De esta manera se puede saber si el valor representativo de cada entrada de las matrices de correlación es significativamente diferente entre los genotipos y entre los experimentos (reposo y estímulo).

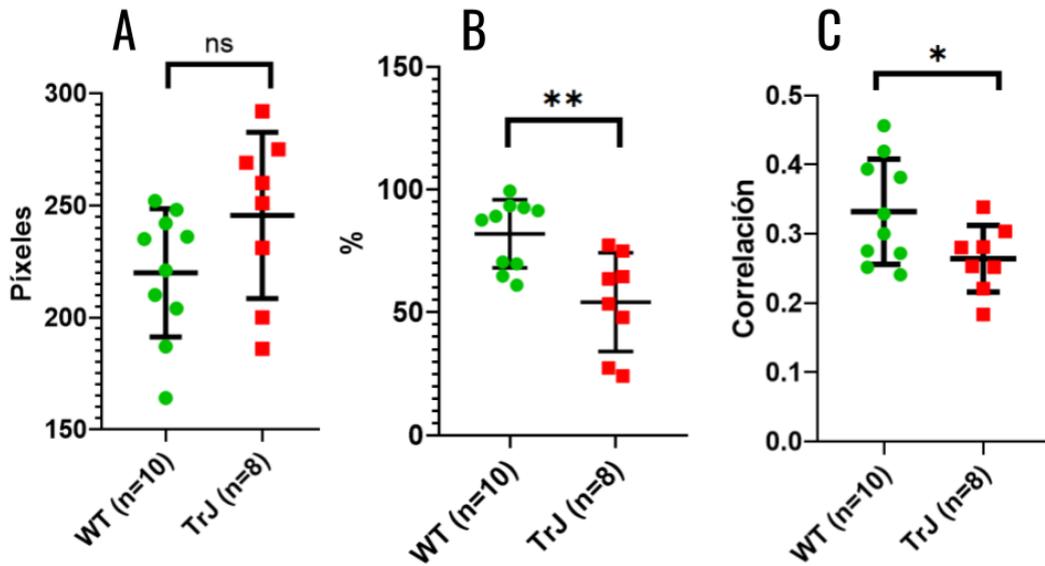
## **5.2. Resultados y discusión**

### **5.2.1. Estudio de la región S1BF**

En primer lugar se realizó el estudio comparativo de los genotipos WT y TrJ para la respuesta al estímulo en la región S1BF. Para cada individuo se computó el área total de la región S1BF y se compararon ambas poblaciones. Como se observa en la figura 5.6A, no se encuentran diferencias significativas para las áreas totales de las regiones S1BF. Sin embargo, como se observa en la figura 5.6B, encontramos que existen diferencias significativas para el área de activación, calculada a partir del porcentaje de la región S1BF activada. Se observa que el genotipo WT tiene un mayor porcentaje de activación que el TrJ.

Si comparamos ahora los valores de correlación promedio de los píxeles activados en la región S1BF, como se observa en la figura 5.6C, nuevamente encontramos diferencias significativas entre ambos genotipos. En este caso los WT presentan un valor de correlación mayor que los TrJ. Por lo tanto, los resultados presentados en la figura 5.6 indican que, no solamente el área de activación es mayor en el genotipo WT, sino que dicha activación está más acoplada al estímulo aplicado.

El siguiente análisis consistió en comparar la tasa de respuesta en ambos genotipos, midiendo la pendiente de la señal Doppler para cada estímulo realizado. Lo

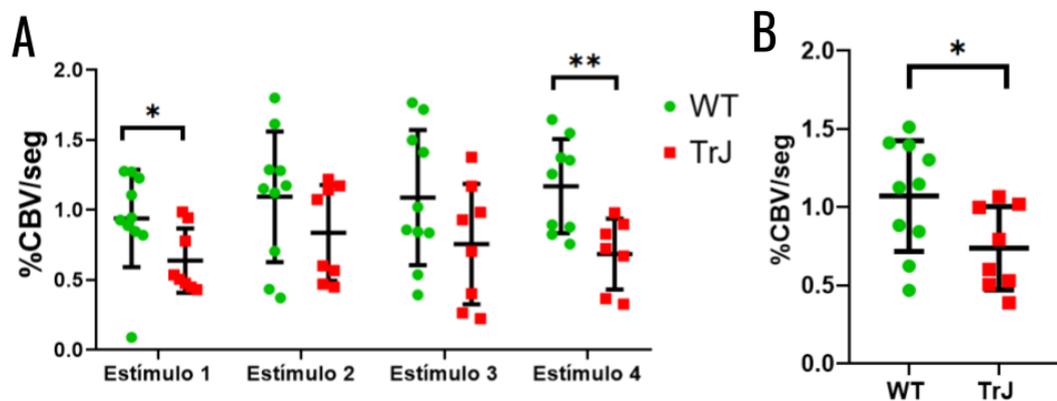


**Figura 5.6:** En todos los casos la cantidad de ratones utilizados fueron 10 WT y 8 TrJ. (A) Área total de la región S1BF por genotipo. Se muestra la media y desviación estándar para comparar las áreas de la región S1BF utilizando el test t-Student ( $\alpha = 0.05$ ). No se encuentran diferencias significativas (p-valor = 0.1173). (B) Porcentaje de activación de S1BF por genotipo. Se muestra la media y desviación estándar, y se aplica el test t-Student no pareado ( $\alpha = 0.05$ ) para constatar diferencias significativas entre genotipos (p-valor = 0.0031). (C) Valor de correlación promedio por genotipo. Se muestra la media y desviación estándar, y se aplica el test t-Student no pareado ( $\alpha = 0.05$ ) para constatar diferencias significativas entre genotipos (p-valor = 0.0434).

que podemos observar en la figura 5.7A es que para todos los estímulos realizados el valor de pendiente fue mayor en el caso de WT. Existen diferencias significativas entre las distribuciones de cada genotipo para el primer estímulo y el último. Considerando el promedio de los 4 estímulos, es decir, obteniendo un valor único por ratón para los 4 estímulos, observamos, como se ve en la figura 5.7B, diferencias significativas entre genotipos.

Si evaluamos cómo evoluciona la pendiente a medida que realizamos los estímulos dentro de un mismo genotipo, no observamos diferencias significativas en ninguno de los casos. Es decir que el valor de pendiente se mantiene relativamente constante para cada grupo como se observa de la distribuciones de puntos de igual color en la figura 5.7A.

Finalmente, en la figura 5.8A se muestra la diferencia en amplitud de la señal en los momentos de estímulo ( $CBV_{ON}$ ) en relación a cuando no se estimula ( $CBV_{OFF}$ ). Como se puede observar, en ambos genotipos, a medida que realizamos nuevos estímulos la amplitud de la señal neurovascular en S1BF se mantiene



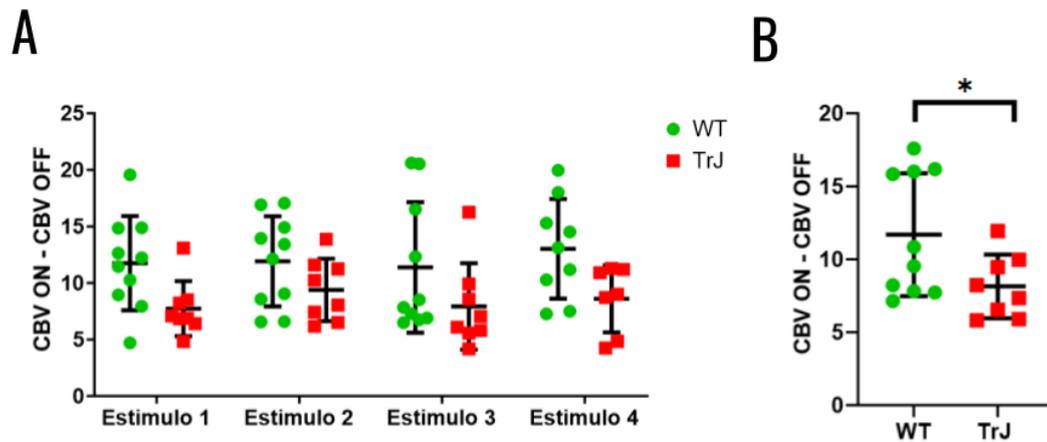
**Figura 5.7:** En todos los casos la cantidad de ratones utilizados fueron 10 WildType y 8 TrJ. (A) Se muestra el valor de pendiente media y desviación estándar para cada distribución por genotipo y por estímulo. En el primer estímulo se observan diferencias significativas entre genotipos, obtenidas a partir de un test de Mann-Whitney con p-valor = 0.0434. También se observan diferencias significativas para el cuarto estímulo calculadas a partir de un test t-Student con p-valor = 0.0067. (B) Se muestra el valor promedio y desviación estándar de pendiente por genotipo considerando los cuatro estímulos. Se constatan diferencias significativas a partir de un test t-Student con p-valor = 0.0422.

constante en el tiempo, por lo cual no encontramos diferencias significativas entre los distintos estímulos por genotipo. En todos los casos tenemos un valor medio mayor en el genotipo WT que en el TrJ, sin embargo no encontramos diferencias significativas al evaluar por estímulo entre genotipos.

A pesar de que la diferencia de amplitud se mantiene constante en el tiempo, los valores de  $CBV_{ON}$  y  $CBV_{OFF}$  aumentan a medida que realizamos nuevos estímulos, esto se puede ver en la figura 3.2 del anexo. Esto indica un aumento global de la señal que podría sugerir algún fenómeno de adaptación.

Si consideramos ahora un valor global al promediar los valores medios de todos los estímulos estímulo para cada ratón (figura 5.8B) observamos diferencias significativas entre ambos grupos, que indican una mayor diferencia en la señal neurovascular entre el momento de estímulo y no estímulo para el genotipo WT.

Estos análisis referentes a estudiar la respuesta al estímulo sugieren diferencias en el funcionamiento de la vía de las vibras para los dos genotipos, tanto a nivel espacial como temporal en la región S1BF. Los ratones TrJ parecen sufrir una afección de dicha vía, manifestada en la capacidad de respuesta (área de activación y valor de correlación) y en la tasa de respuesta (pendiente de la señal temporal). Esto implica una diferencia funcional a nivel del sistema nervioso central, lo cual, hasta nuestro conocimiento, es la primera vez que se manifiesta en la literatura.



**Figura 5.8:** Comparación entre genotipos (10 ratones WT y 8 ratones TrJ) del valor de  $\%CBV$  en los intervalos de estímulo ( $CBV_{ON}$ ) en relación al los momentos de no estímulo ( $CBV_{OFF}$ ) para la región S1BF. (A) Discriminando por genotipo y por estímulo se muestran las distribuciones, con valor medio y desviación estándar, de la amplitud de la señal neurovascular calculada como  $\%CBV_{ON} - \%CBV_{OFF}$ . (B) Se muestra un valor global de la diferencia en amplitud de la señal entre los momentos de estímulo y no estímulo calculada a partir del promedio de todos los intervalos para cada ratón. Se observan diferencias significativas obtenidas con un test t-Student con un p-valor = 0.0471.

Cabe mencionar que el análisis estadístico presentado en la figura 5.7A y 5.8A no contempla un modelo de interacción entre distintos estímulos para un mismo genotipo. Es decir, se testean las diferencias entre genotipos por estímulo y las diferencias entre estímulos dentro de un genotipo, considerando las distribuciones como independientes. Se probó un modelo ANOVA mixto de interacción entre estas variables obteniendo incluso más diferencias entre genotipos. Los resultados no se presentan aquí ya que están por fuera del alcance de la tesis.

### 5.2.2. Redes funcionales del cerebro

En esta sección nos centramos en analizar las redes funcionales del cerebro para los estados de reposo y estímulo en los genotipos WT y TrJ. En este caso utilizamos 6 ratones WT para generar la red de reposo y la misma cantidad para la red de estímulo; 5 ratones TrJ para la red de reposo y 6 para la de estímulo. Se tomaron en cuenta únicamente aquellos ratones que tengan una clara respuesta funcional en S1BF y que además no hayan presentado alteraciones durante el estado de reposo (como despertarse de la anestesia o la presencia de eventos sensoriales externos que puedan influir en el reposo).

Cuando se realiza un análisis de conectividad entre regiones, se pueden obtener

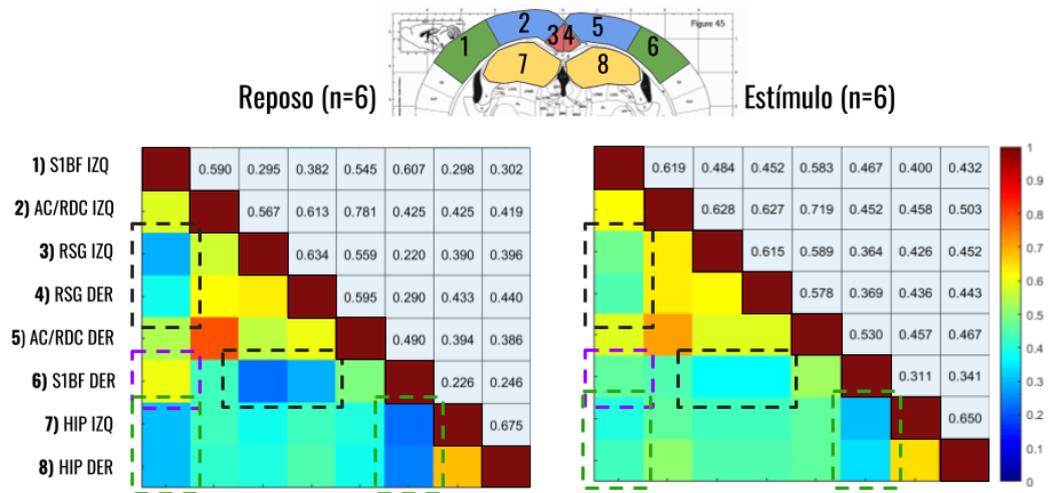
valores positivos o negativos dependiendo de si esas regiones están correlacionadas o anti-correlacionadas. En muchos casos dos regiones pueden estar fuertemente acopladas por una anti-correlación, lo que sugiere una relación funcional. En las matrices de correlación entre regiones, que se presentan en las secciones [5.2.2.1](#) y [5.2.2.2](#), los valores de correlación resultan ser positivos en todos los casos. Dado que no observamos valores de correlación negativos, correspondientes a anti-correlación, la escala de colores presentada incluye únicamente valores positivos para una mejor visualización.

### 5.2.2.1. Ratones WildType estímulo vs reposo

En primer lugar, evaluamos las redes WT para ambos estados, con el objetivo de estudiar el funcionamiento en un modelo que se puede considerar "sano". Esto lo comparamos con un trabajo donde se generan las mismas redes para el mismo genotipo (Ferrier et al. [2020](#)). La figura [5.9](#) muestra las matrices de conectividad obtenidas para el genotipo WT en los estados de *estímulo* y *reposo*.

Sabemos de la literatura, que en el estado de reposo existe una conexión inter-hemisférica propia en roedores (Gozzi y Schwarz, [2016](#))(Kannurpatti et al. [2008](#))(Zhao et al. [2008](#)), particularmente entre regiones análogas entre hemisferios como S1BF IZQ y S1BF DER. Esto se puede observar en la alta correlación ( $0.607 \pm 0.065$ ) observada entre estas dos regiones, representada por la entrada (1,6) en la matriz de reposo de la figura [5.9](#), y marcada con un recuadro violeta. Si comparamos con la misma entrada de la matriz de estímulo, observamos una variación en el valor de conectividad, siendo en este último caso menor ( $0.467 \pm 0.194$ ). Es decir, al momento de aplicar un estímulo se pierde la lateralidad o conectividad inter-hemisférica entre estas dos regiones. Podemos considerar entonces como un funcionamiento "normal", que al recibir un estímulo en S1BF la actividad neurovascular de esta región se centra en procesar dicho estímulo sin enviar información hacia la corteza análoga en el otro hemisferio.

Por otro lado, la corteza retrosplenial (RSG) se describe como un posible núcleo o "hub" de la red por defecto (Default Mode Network, DMN) en ratones (Ferrier et al. [2020](#)). La DMN es una red de regiones temporalmente correlacionadas que se activan mientras el individuo no está realizando una tarea específica (Gozzi y Schwarz, [2016](#)) y es una de las redes más estudiadas en experimentos de reposo. Como se puede observar en la matriz de reposo de la figura [5.9](#) (panel izquierdo), las regiones RSG DER y RSG IZQ se encuentra muy poco correlacionadas con la corteza



**Figura 5.9:** Comparación entre las matrices de correlación de regiones para los experimentos de estímulo y reposo en el genotipo WT. Las matrices se construyen a partir del promedio de 6 matrices de estímulo y 6 matrices de reposo, correspondientes a la cantidad de ratones utilizados. Por lo tanto, cada entrada de la matriz es la media del conjunto correspondiente. En el panel superior se describe la numeración utilizada para cada región y sobre la izquierda se colocan los nombres abreviados según la figura 5.2. Los recuadros violetas indican la diferencia en el valor de correlación en la conectividad de las regiones 1 y 6. De forma análogo los otros recuadros subrayan las diferencias en las regiones 1 y 6 con la 3 y 4, y, 1 y 6 con la 7 y 8.

somatosensorial en ambos hemisferios, S1BF DER ( $0.290 \pm 0.158$  y  $0.220 \pm 0.155$  respectivamente) y S1BF IZQ ( $0.382 \pm 0.166$  y  $0.295 \pm 0.232$  respectivamente), indicado por el recuadro en negro. Esto indica, que en estado de reposo estas regiones responden a funcionalidades distintas. En cambio, si observamos la matriz de estímulo de la figura 5.9 (panel derecho), vemos que cuando la región S1BF IZQ es activada, tanto la propia S1BF IZQ como la contralateral S1BF DER, aumentan su conectividad con las regiones RSG DER ( $0.452 \pm 0.171$  y  $0.369 \pm 0.175$  respectivamente) y RSG IZQ ( $0.484 \pm 0.132$  y  $0.364 \pm 0.186$  respectivamente). Esto sugiere que al momento de recibir un estímulo sensorial en S1BF esta región intensifica su conexión con RSG para un correcto procesamiento de la información.

Finalmente, si nos centramos en la región del hipocampo, área clave en los procesos de memoria y aprendizaje, vemos que en la red de reposo las regiones HIP DER e HIP IZQ aparecen muy poco conectadas con el resto de las regiones y muy conectadas entre ellas. En particular las regiones S1BF DER y S1BF IZQ tienen una correlación pequeña con el hipocampo (recuadro verde en la figura 5.9). Por ejemplo, para el HIP IZQ estos valores son  $0.226 \pm 0.144$  y  $0.298 \pm 0.147$  respec-

tivamente. Considerando ahora la matriz de estímulo, observamos que el valor de correlación para S1BF IZQ, es decir donde se aplica el estímulo, y la región HIP IZQ, aumenta con respecto al estado de reposo ( $0.400 \pm 0.150$ ). Lo mismo ocurre para la región S1BF DER y la región HIP IZQ ( $0.311 \pm 0.208$ ). El aumento de conexión de la corteza somatosensorial con el hipocampo en el experimento de estímulo, parece indicar un necesario intercambio de información entre una región asociada específicamente a lo sensoriomotor con una región asociada a la memoria. Esto sugiere, que para un correcto procesamiento de la información sensorial del medio, se debe recurrir a procesos de aprendizajes previamente adquiridos almacenados en el hipocampo.

En el trabajo de (Ferrier et al. 2020) se estudia la conectividad cerebral en ratones WT para un estado de activación y un estado de reposo. Allí, al igual que en nuestro trabajo, los resultados indican una desconexión inter-hemisférica en la S1BF y de la S1BF con RSG en el momento en que el ratón está siendo estimulado. Sin embargo, en Ferrier et al. 2020 las matrices de conectividad para el estado de reposo y estímulo se construyen de forma distintas a nuestro caso. Para la matriz de activación se concatenan los períodos temporales donde se estimuló al ratón. Para la matriz de reposo o no activación se concatenan periodos donde no se estimula, lo cual denominan estado base. Es decir que el experimento compara los momentos en donde se está estimulando y los momentos que se deja de estimular. En nuestro caso estamos comparando dos series de experimentos distintos, ya que el estado de descanso o base corresponde a varios minutos del animal dormido sin recibir un estímulo específico. Por otro lado, nuestras matrices de estímulo se construyen considerando tanto momentos donde se estimula como momentos donde no se estimula, lo que corresponde a evaluar el comportamiento a lo largo de todo el experimento.

Creemos que nuestra metodología se corresponde mejor con el objetivo de ver diferencias entre un cerebro en reposo, o sin una tarea específica, y un cerebro activo, debido a que la concatenación de señales puede generar correlaciones espurias. Esto se da porque todas las señales recortadas tendrán un salto o caída en el momento de transición de estímulo a no estímulo o viceversa, aumentando espuriamente el valor de correlación. De todas formas, realizamos la construcción análoga de las matrices descritas en el trabajo de Ferrier et al. 2020 para verificar la concordancia de los resultados. Esto se puede observar en el Anexo (figuras A3.3 y A3.4), donde se muestra que los resultados continúan la tendencia observada en la figura 5.9, y además se corresponden con lo encontrado por Ferrier et al. 2020.

### 5.2.2.2. Ratones Trembler-J estímulo vs reposo

Lo siguiente que realizamos fue analizar las matrices de reposo y estímulo para el genotipo TrJ, tal como se observa en la figura 5.10. En primer lugar observamos, que la regiones S1BF DER y S1BF IZQ están más conectadas en la matriz de reposo que en la de estímulo ( $0.719 \pm 0.122$  y  $0.623 \pm 0.135$ ), lo cual es concordante con la desconexión inter-hemisférica al aplicar el estímulo descrita en la literatura y observada en los experimentos con WT.

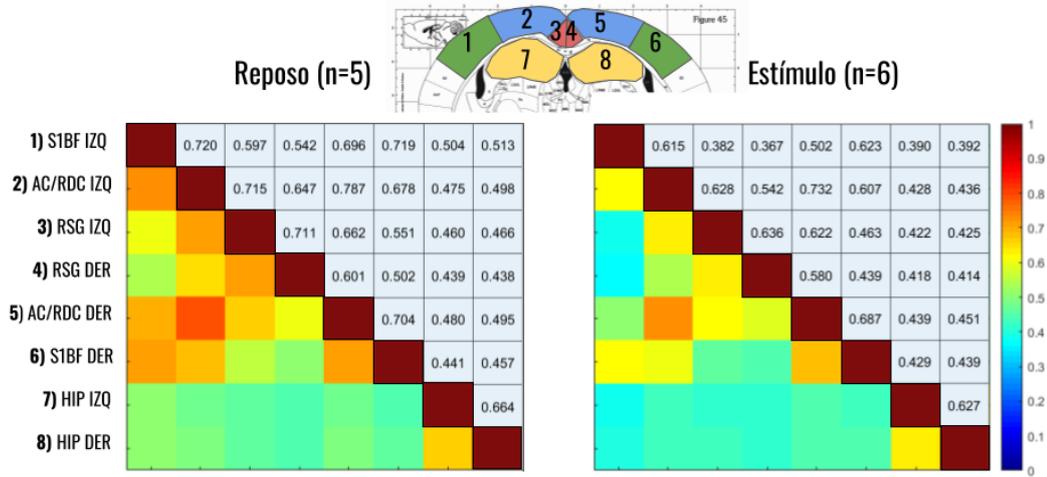
Si analizamos las regiones RSG DER y RSG IZQ podemos observar que en el estado de reposo se encuentran más conectadas con las regiones S1BF DER y S1BF IZQ comparado al estado de estímulo. Por ejemplo, el valor promedio de conexión para esas cuatro entradas (1-3,1-4,6-3,6-4) es  $0.548 \pm 0.039$  en el estado de reposo y  $0.413 \pm 0.046$  en el estímulo. Este comportamiento es opuesto a lo observado en el genotipo WT, donde dichas regiones aparecen más conectadas en el estado de estímulo.

En relación al hipocampo, observamos que, para ambos estados, la conectividad de esta estructura con todas las demás regiones de la corteza es baja, mientras que la conectividad entre HIP IZQ e HIP DER es alta. Esto es análogo a lo que se observa en el modelo WT. Por ejemplo, para la matriz de reposo, el promedio de correlación entre HIP IZQ y todas las regiones corticales (de la 1 a la 6) es  $0.472 \pm 0.026$ , mientras que la conectividad para HIP IZQ e HIP DER es  $0.664 \pm 0.079$ . Esta tendencia también se observa en la matriz de estímulo, donde los valores son  $0.424 \pm 0.018$  y  $0.627 \pm 0.106$  respectivamente.

### 5.2.2.3. Ratones WildType vs Ratones Trembler-J

Si comparamos ahora entre genotipos el estado de reposo, lo que observamos es una conectividad global aumentada en el modelo TrJ. Las estructuras funcionales, es decir la red cerebral, parecen ser las mismas pero con valores de correlación mayores. Tomando un valor promedio de conectividad global para cada genotipo, calculado como el promedio de los valores de correlación de cada matriz, tenemos WT =  $0.451 \pm 0.147$  y TrJ =  $0.577 \pm 0.111$ .

Esta tendencia también se observa en las matrices de estímulo al comparar por genotipo. Especialmente, en S1BF DER, la región cortical contralateral a la activada, se muestra menos conectada con el resto del cerebro en el caso del WT que en el modelo TrJ. Si tomamos el promedio de valores de correlación de esta región con todas las demás tenemos que para WT =  $0.405 \pm 0.079$  y para TrJ =  $0.527 \pm 0.108$ .



**Figura 5.10:** Comparación entre las matrices de correlación de regiones para los experimentos de estímulo y reposo en el genotipo TrJ. Las matrices se construyen a partir del promedio de 6 matrices de estímulo y 5 matrices de reposo, correspondientes a la cantidad de ratones utilizados. Por lo tanto, cada entrada de la matriz es la media del conjunto correspondiente.

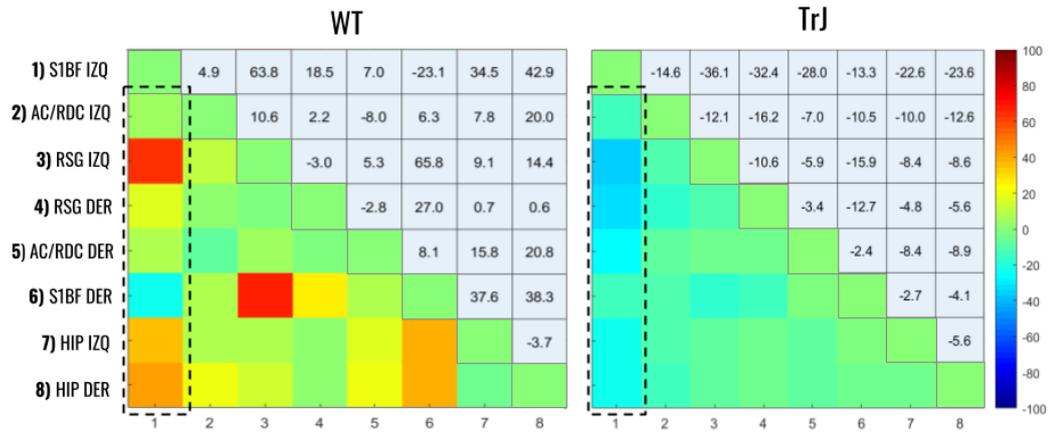
En particular, nos interesa estudiar cómo es la transición entre el estado de estímulo y reposo para cada genotipo. Para ello, calculamos la matriz de diferencia relativa porcentual. El valor de cada entrada se computó de la siguiente manera:

$$diferencia(i, j) = 100 \times \frac{estimulo(i, j) - reposo(i, j)}{reposo(i, j)} \quad (5.2)$$

donde  $diferencia(i, j)$  corresponde a la entrada  $(i, j)$  de la matriz de diferencia relativa porcentual, y de forma análoga  $estimulo(i, j)$  y  $reposo(i, j)$  corresponden a las entradas  $(i, j)$  de las matrices de estímulo y reposo respectivamente. En la figura 5.11 se observan las matrices de diferencia relativa porcentual para ambos genotipos.

Nos centramos en analizar la conexión de la región S1BF IZQ con las demás (recuadro en negro en las matrices de la figura 5.11), donde se observan las principales diferencias. En el modelo WT hay un decremento de 23 % de la conectividad entre la región S1BF DER y S1BF IZQ, mientras que en el genotipo TrJ este decremento es de 13 %.

También se observa que, para el genotipo WT, S1BF IZQ tienen una conectividad 65 % mayor con la región RSG IZQ en el estado de estímulo en comparación al reposo. En el caso del TrJ la tendencia es inversa, esta entrada tiene un valor negativo que representan una mayor conexión en el reposo que en el estímulo. El



**Figura 5.11:** Matrices de diferencia entre los estados de estímulo y de reposo para los genotipos WT y TrJ. Cada matriz se computa como la diferencia relativa porcentual, entrada a entrada, de las matrices asociadas al estímulo con la matriz asociada al reposo para el genotipo WT (figura 5.9) y para el TrJ (figura 5.10). En recuadros negros se destacan las conexiones relevantes para evaluar el comportamiento diferencial entre genotipos, correspondientes a la conectividad de la región S1BF IZQ y todas las demás.

mismo comportamiento se observa para S1BF IZQ con las regiones hipocampales 7 y 8, donde la conectividad es más elevada en el estado de estímulo que en reposo por aproximadamente un 35-40 % en el genotipo WT, mientras que en el modelo TrJ las entradas son negativas.

Estas diferencias también se observan para la región S1BF DER, la región cortical contra lateral a donde se aplicó el estímulo. En el caso del genotipo WT, esta región se conecta más con RSG y el hipocampo en el estímulo en comparación al reposo, mientras que en el genotipo TrJ el comportamiento es inverso.

Cabe mencionar que en todos los casos se realizó un estudio estadístico para comparar la distribución de píxeles análogos entre dos matrices, no encontrando diferencias significativas en ningún caso. Las matrices de desviación estándar de las distribuciones se pueden encontrar en el Anexo. Se puede observar que la incertidumbre relativa para cada píxel se encuentra en el entorno de un 15-20 %. Para trabajos futuros se espera incrementar el número de individuos para evaluar si es posible encontrar diferencias cuantificables entre genotipos para cada región de conectividad.

Este primer acercamiento a estudiar las redes del cerebro en ambos modelos de ratones, evidencia diferencias en el funcionamiento a nivel del sistema nervioso central en el modelo TrJ respecto al WT. Esto se encuentra en la línea de trabajos

recientes donde se destaca la influencia de la enfermedad Charcot-Marie-Tooth a nivel del sistema nervioso central al estudiar el modelo TrJ (Damian et al. [2021](#)).

A nuestro entender, esta es la primera vez que se realiza un estudio neurovascular de redes del cerebro en el modelo animal TrJ. También es el primer trabajo en donde se utiliza ultrasonido funcional para definir una red de reposo donde se deja por varios minutos al animal anestesiado sin generar estímulos externos. Esto aplica tanto para el modelo TrJ como para el WT. Creemos que esta metodología es la más conveniente para estudiar las redes de reposo, ya que se obtiene un amplio registro temporal de la señal neurovascular, evitando así efectos transitorios, que permite analizar de forma correcta la interacción entre regiones.

# Capítulo 6

## Conclusiones

La tesis estuvo enmarcada en el proyecto de investigación multidisciplinario (código ANII: FCE\_1\_2019\_1\_155539) que tuvo como objetivo integrar las áreas de imagenología vascular por ultrasonido, con el análisis biológico de modelos de neurodegeneración, más específicamente, para un modelo murino asociado a la enfermedad Charcot-Marie-Tooth.

Logramos implementar satisfactoriamente la imagenología Doppler Ultrarrápida, técnica no invasiva que consiste en aplicar ultrasonido para analizar los cambios en volumen sanguíneo en pequeños vasos del cerebro. Particularmente, a través del análisis funcional denominado Ultrasonido Funcional (fUS), pudimos comprender en mayor profundidad las implicancias de la enfermedad Charcot-Marie-Tooth en el sistema nervioso.

Desde el punto de vista personal, esta tesis me permitió insertarme en un grupo de trabajo interdisciplinario, donde parte del cometido consistió en desarrollar un lenguaje común entre las distintas áreas, enriqueciendo enormemente el proceso de investigación. Me introdujo en la experimentación biológica y me permitió desarrollar nuevas perspectivas e ideas para abordar un problema científico. Además, tuve la posibilidad de participar en numerosas instancias de presentación del trabajo para públicos ampliamente diversos, lo cual, nuevamente, creo que ha enriquecido mi capacidad como científico y no solamente como físico.

## **6.1. Puesta a punto de la técnica y análisis de la sensibilidad del Doppler Ultrarrápido**

Como logros intermedios de este trabajo de tesis, que sirvieron de base para el objetivo general, podemos destacar en primer lugar la instrumentación y optimización de la técnica de imagenología Doppler Ultrarrápida, siendo el primer grupo de investigación que logra desarrollarla a nivel local y regional. La metodología que se presentó aquí sienta las bases para futuros trabajos utilizando Doppler Ultrarrápido, y abre las puertas a colaboraciones interdisciplinarias para estudios neurológicos y vasculares.

En segundo lugar, se validó la sensibilidad del Doppler Ultrarrápido para detectar cambios en el flujo sanguíneo entre dos grupos de ratones. Esto consistió en un estudio combinado entre imagenología Doppler Ultrarrápida y Microscopía Confocal. En dicho trabajo estudiamos los efectos del envejecimiento en la neurovascularización de ratones Wild Type (WT), y pudimos constatar que el Doppler Ultrarrápido es una herramienta sensible para detectar dichas variaciones fisiológicas. La perfusión sanguínea y la red vascular se encuentran deterioradas en ratones adultos viejos en comparación a ratones adultos jóvenes. Este enfoque combinado resulta algo nuevo para la literatura disponible y los resultados aportan un mayor entendimiento de los procesos de envejecimiento neurovascular. Este trabajo se encuentra condensado en el artículo publicado (Anzibar Fialho; Vázquez Alberdi; Martínez et al. [2022](#)).

## **6.2. Ultrasonido funcional para analizar el modelo de neurodegeneración de la enfermedad Charcot-Marie-Tooth**

Como objetivo principal, esta tesis se proponía utilizar fUS para estudiar el modelo de ratón Trembler-J (TrJ), que emula con alta fidelidad biológica la neuropatía hereditaria Charcot-Marie-Tooth. En ese sentido, el primero de los aportes de esta tesis fue implementar la técnica de fUS, la cual consiste en obtener datos de variación de flujo sanguíneo en función del tiempo y analizar cómo responden las distintas partes del cerebro a un estímulo específico. Nuevamente, esta es la primera vez que un grupo de investigación local y regional utiliza fUS para un análisis dinámico del sistema nervioso central.

En segundo lugar se estudió la respuesta somatosensorial a un estímulo mecánico externo de las vibrisas (correspondiente a la tigmotáxis de las vibrisas), en el modelo de ratón sano WT y en el modelo de neurodegeneración TrJ. Se constató la correcta activación de la región cerebral cortical asociada al movimiento y control de las vibrisas durante los momentos donde el animal recibía el estímulo.

Posteriormente, se identificaron parámetros funcionales de la activación cortical, como la capacidad y el tiempo de respuesta al estímulo, para poder comparar entre ambos genotipos. El modelo TrJ mostró niveles y modalidades de expresión significativamente distintos a los observados en el genotipo saludable. Estos resultados sugieren una clara afección de la vía somatosensorial de las vibrisas en el modelo Tr-J.

En tercer lugar, se definieron y construyeron redes funcionales del cerebro, para ambos modelos de ratones, bajo dos estados funcionales: estímulo y reposo. Hasta nuestro conocimiento es la primera vez que se reporta una red de reposo construida a partir de la actividad cerebral del individuo sedado y sin estímulos externos por más de 5 minutos. Esto aplica para ambos modelos de ratones. También es la primera vez que se realiza un análisis a partir de redes del cerebro para el modelo TrJ.

A partir de las redes construidas para cada genotipo se comparó la conectividad en cada uno de los estados. Reportamos diferencias en las redes de estímulo y de reposo en el modelo TrJ en comparación al modelo sano WT. Esto representa un importante hallazgo a nivel biológico, demostrando que la enfermedad también afecta la neurovasculatura a nivel del sistema nervioso central, ya que hasta el momento es considerada casi exclusivamente como una afección periférica.

Estos resultados sugieren la necesidad de promover un cambio de paradigma en la comprensión de la afección CMT-1E. Señalan un rol no descrito hasta ahora en el fenotipo clínico TrJ referente a cómo es el impacto sobre la respuesta vascular, en este caso medida a través de fUS. Posibilitan una comprensión más profunda de la neuropatía, que puede abrir un nuevo panorama desde un punto de vista médico terapéutico o de diagnóstico.

## Capítulo 7

# Consideraciones generales y perspectivas a futuro

Como reflexiones finales esta tesis abre una nueva línea de investigación a nivel local, que se consolida con trabajos actualmente en desarrollo y gran potencial a futuro para realizar diversos tipos de estudios neurológicos. Durante el transcurso de la misma los resultados satisfactorios permitieron la escritura de artículos y presentaciones en congresos internacionales con repercusiones sumamente positivas.

La satisfactoria implementación de la técnica de Doppler Ultrarrápido abre un gran abanico de posibles trabajos futuros, tanto desde el enfoque de análisis de flujo, como se describió en el capítulo 4, como en la implementación de nuevos diseños experimentales para realizar ultrasonido funcional, tal como se describió en el capítulo 5.

### 7.1. Trabajos futuros con fUS aplicado a estudiar la neuropatía Charcot-Marie-Tooth

Como primer trabajo a futuro, correspondería incrementar el número de ratones utilizados en el estudio, para evaluar si las diferencias observadas en la conectividad entre los genotipos Wild Type (WT) y Trembler-J (TrJ) son estadísticamente significativas. En conjunto con esto, desarrollar un análisis estadístico más completo donde se contemple la interacción mixta de las distintas regiones y no solamente la comparación entrada a entrada.

En segundo lugar, una de las principales ventajas del Doppler ultrarrápido radica en la capacidad de obtener imágenes transcraniales de calidad (capítulo 5). El hecho

de no realizar un procedimiento invasivo en el ratón (como una craneotomía o un afinamiento del cráneo) permite realizar múltiples estudios en el mismo animal. No solamente para repetir la experiencia en caso de ser necesario, optimizando de esta forma los recursos, sino también como posibilidad de realizar un seguimiento en el desarrollo del individuo.

Un ejemplo de esto corresponde al proyecto de doctorado de la estudiante Mariana Martínez, que se desarrolla de forma paralela a los trabajos presentados en esta tesis. En el trabajo de Martínez se utiliza fUS para estudiar el desarrollo de ratones TrJ sometidos a una dieta en base a curcumina. Esta sustancia ha sido descrita como un componente bioactivo capaz de modular los procesos de autofagia en desordenes neurológicos o neuromusculares (Vazquez Alberdi et al. 2022), (Perrone et al. 2019). En dicho trabajo se realiza un análisis del flujo sanguíneo como el presentado en el capítulo 4 a ratones jóvenes de entre 2 y 3 meses. Pero en este caso se toman imágenes sin la necesidad de realizar una intervención quirúrgica debido a su joven edad. Luego, estos ratones son sometidos a una dieta específica por un periodo de 5 meses, y finalmente se vuelven a tomar imágenes, en este caso si realizando una craneotomía. De esta forma se puede evaluar previo al tratamiento y posterior al mismo.

Un diseño experimental sostenido en el tiempo también permite el análisis de los cambios en la conectividad o dinámica central en las distintas etapas. Para los ratones jóvenes utilizados en el estudio funcional presentado en el capítulo 5, se realizó de forma análoga el mismo procedimiento pero 5 meses después (en este caso si con craneotomía). Estos datos aún no fueron analizados pero creemos que contienen un gran potencial para comparar el desarrollo de cada genotipo.

## **7.2. Análisis adicionales para estudiar las redes del cerebro**

Respecto al estudio de la conectividad presentado en el capítulo 5 consideramos que a futuro se puede complementar con diversos análisis. En primer lugar se puede abordar la relación funcional de las distintas regiones utilizando la técnica de *Independent Component Analysis*, la cual permite separar los distintos componentes de la señal Doppler en patrones espaciotemporales específicos. Esta técnica es ampliamente utilizada en el análisis de estudios de resonancia magnética funcional (McKeown y Sejnowski, 1998) y también recientemente aplicada para señales de

fUS con el objetivo de encontrar redes cerebrales subyacentes (Ferrier et al. 2020).

En segundo lugar se puede estudiar la señal Doppler en distintas condiciones dinámicas del cerebro combinando las metodologías presentes en este trabajo. Por ejemplo, aplicando la segmentación en cuartiles, estudiar cómo es la distribución del flujo en el hipocampo en el estado de activación en comparación a cuando no se está estimulando. También comparar las distribuciones entre genotipos, evaluando si se dan diferencias en el estado de activación o en el estado de reposo, o en ambos.

En el caso del genotipo TrJ resulta de gran importancia estudiar la distribución de flujo a nivel del hipocampo debido a las evidencias previas de alteraciones en dicha estructura (Damian et al. 2021). De esta forma el ultrasonido lograría dar una perspectiva de las afecciones neurovasculares de dicha estructura en el modelo TrJ.

También en el proyecto de doctorado de Mariana Matrínez se implementó la segmentación en cuartiles para estudiar posibles diferencias entre WT y TrJ a nivel del hipocampo. En el mismo, se encuentra una perfusión aumentada en el modelo TrJ. Esto combinado a los resultados presentados en la presente tesis (capítulo 5) pueden adelantar una posible hipótesis de una mayor actividad cerebral continua en el modelo TrJ comparado al WT. Esto puede relacionarse a los cambios en el comportamiento, específicamente a los niveles de ansiedad, que se verifican en el trabajo de Damian et al. 2021.

### **7.3. Mejoras y nuevas posibilidades de implementar la caracterización del flujo con imagenología Doppler Ultrarrápida**

Adicionalmente, no solo se puede estudiar la distribución de flujo a nivel del hipocampo sino en otras áreas del cerebro. En este trabajo la elección del hipocampo para estudiar los efectos de envejecimiento radican en su capacidad neurogénica y funcionalidad asociada a procesos de memoria, así como la relativa facilidad de identificarlo en las imágenes Doppler. Sin embargo, resulta de interés evaluar otras regiones que también puedan estar comprometidas en los procesos de envejecimiento. Por ejemplo, la técnica de segmentación en cuartiles puede ser aplicada de forma análoga a una región específica de la corteza.

Cabe mencionar que el tratamiento de los datos desarrollado en el capítulo 4 corresponde a realizar la segmentación en cuartiles utilizando la imagen en decibeles.

Mientras que lo desarrollado en el capítulo 5 se basa en estudiar la imagen utilizando el valor de intensidad propio de la señal Doppler. Es decir, no hay un pasaje a decibeles, sino que se trabaja en valores relativos de variación de CBV. En este caso creemos que el segundo tratamiento corresponde a una representación más fidedigna de la medida real del flujo. Esto se debe a que la escala en decibeles depende del valor de referencia de máxima intensidad, el cual puede estar afectado por la presencia de artefactos en la imagen, lo cual generaría un corrimiento de valores. Por ejemplo, un punto de alta intensidad que no corresponde al flujo. Para evaluar que los resultados presentados en el capítulo 4 no tuvieran este sesgo debido al cambio de escala, analizamos la distribución de los valores de referencia para cada uno de los grupos. No encontramos diferencias significativas en los valores medios de las distribuciones, lo cual indica que los valores de referencia de la escala de decibeles (tomados dentro del hipocampo) corresponden a valores de señal Doppler y no a artefactos.

## Referencias bibliográficas

- Altman, J., y Das, G. D. (1965). Post-natal origin of microneurones in the rat brain. *Nature*, 207(5000), 953-956.
- An, D., Yu, P., Freund, K. B., Yu, D.-Y., y Balaratnasingam, C. (2020). Three-dimensional characterization of the normal human parafoveal microvasculature using structural criteria and high-resolution confocal microscopy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 61(10), 3-3.
- Angelsen, B. A. (1980). A theoretical study of the scattering of ultrasound from blood. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, (2), 61-67.
- Angelsen, B. A. (1981). Instantaneous frequency, mean frequency, and variance of mean frequency estimators for ultrasonic blood velocity Doppler signals. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, (11), 733-741.
- Anzibar Fialho; Vázquez Alberdi; Martínez, M., Vázquez Alberdi, L., Martínez, M., Calero, M., Baranger, J., Tanter, M., Damián, J. P., Negreira, C., Rubido, N., Kun, A., et al. (2022). Intensity distribution segmentation in ultrafast Doppler combined with scanning laser confocal microscopy for assessing vascular changes associated with ageing in murine hippocampi. *Scientific Reports*, 12(1), 1-10.
- Arciniegas, E., Carrillo, L. M., Rojas, H., Pineda, J., Ramirez, R., Reyes, O., Chopite, M., y Rocheta, A. (2021). Plump endothelial cells integrated into pre-existing venules contribute to the formation of ‘mother’ and ‘daughter’ vessels in pyogenic granuloma: possible role of galectin-1,-3 and-8. *Scars, Burns & Healing*, 7, 2059513120986687.
- Babcock, D., Patriquin, H., LaFortune, M., y Dauzat, M. (1996). Power Doppler sonography: basic principles and clinical applications in children. *Pediatric radiology*, 26(2), 109-115.
- Baranger, J., Arnal, B., Perren, F., Baud, O., Tanter, M., y Demene, C. (2018). Adaptive spatiotemporal SVD clutter filtering for ultrafast Doppler imaging

- using similarity of spatial singular vectors. *IEEE transactions on medical imaging*, 37(7), 1574-1586.
- Baranger, J., Demene, C., Frerot, A., Faure, F., Delanoe, C., Serroune, H., Houdouin, A., Mairesse, J., Biran, V., Baud, O., et al. (2021). Bedside functional monitoring of the dynamic brain connectivity in human neonates. *Nature communications*, 12(1), 1080.
- Benito, N., Martin-Vazquez, G., Makarova, J., Makarov, V. A., y Herreras, O. (2016). The right hippocampus leads the bilateral integration of gamma-parsed lateralized information. *Elife*, 5, e16658.
- Bentivoglio, M., Cotrufo, T., Ferrari, S., Tesoriero, C., Mariotto, S., Bertini, G., Berzero, A., y Mazzarello, P. (2019). The original histological slides of Camillo Golgi and his discoveries on neuronal structure. *Frontiers in neuroanatomy*, 13, 3.
- Bercoff, J., Montaldo, G., Loupas, T., Savery, D., Meziere, F., Fink, M., y Tanter, M. (2011). Ultrafast compound Doppler imaging: Providing full blood flow characterization. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 58(1), 134-147.
- Bertolo, A., Nouhoum, M., Cazzanelli, S., Ferrier, J., Mariani, J.-C., Kliewer, A., Belliard, B., Osmanski, B.-F., Deffieux, T., Pezet, S., et al. (2021). Whole-brain 3D activation and functional connectivity mapping in mice using transcranial functional ultrasound imaging. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (168), e62267.
- Bryant, C. D. (2011). The blessings and curses of C57BL/6 substrains in mouse genetic studies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1245, 31.
- Cajal, R. S. (1911). Histologie du systeme nerveux de l'Homme et des Vertebres. Grand sympathique. *Paris Maloine*, 2, 891-942.
- Cervos-Navarro, J., y Diemer, N. (1991). Selective vulnerability in brain hypoxia. *Critical reviews in neurobiology*, 6(3), 149-182.
- Cox, R. W., y Jesmanowicz, A. (1999). Real-time 3D image registration for functional MRI. *Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, 42(6), 1014-1018.
- Croft, W. J. (2006). *Under the microscope: a brief history of microscopy* (Vol. 5). World Scientific.
- Daly, C. J. (2019). Examining vascular structure and function using confocal microscopy and 3d imaging techniques. En *Biomedical Visualisation* (pp. 97-106). Springer.

- Damian, J. P., Vázquez Alberdi, L., Canclini, L., Rosso, G., Bravo, S. O., Martínez, M., Uriarte, N., Ruiz, P., Calero, M., Di Tomaso, M. V., et al. (2021). Central alteration in peripheral neuropathy of Trembler-J mice: Hippocampal pmp22 expression and behavioral profile in anxiety tests. *Biomolecules*, *11*(4), 601.
- De Castro, F., y Merchan, M. A. (2016). The major discoveries of Cajal and his disciples: consolidated milestones for the neuroscience of the XXIst century.
- De Silva, T. M., y Faraci, F. M. (2016). Microvascular dysfunction and cognitive impairment. *Cellular and molecular neurobiology*, *36*(2), 241-258.
- Demene, C., Deffieux, T., Pernot, M., Osmanski, B.-F., Biran, V., Gennisson, J.-L., Sieu, L.-A., Bergel, A., Franqui, S., Correas, J.-M., et al. (2015). Spatiotemporal clutter filtering of ultrafast ultrasound data highly increases Doppler and fUltrasound sensitivity. *IEEE transactions on medical imaging*, *34*(11), 2271-2285.
- Demene, C., Robin, J., Dizeux, A., Heiles, B., Pernot, M., Tanter, M., y Perren, F. (2021). Transcranial ultrafast ultrasound localization microscopy of brain vasculature in patients. *Nature biomedical engineering*, *5*(3), 219-228.
- Demeulenaere, O., Bertolo, A., Pezet, S., Ialy-Radio, N., Osmanski, B., Papadacci, C., Tanter, M., Deffieux, T., y Pernot, M. (2022). In vivo whole brain microvascular imaging in mice using transcranial 3D Ultrasound Localization Microscopy. *EBioMedicine*, *79*, 103995.
- Desjardins, M., Berti, R., Lefebvre, J., Dubeau, S., y Lesage, F. (2014). Aging-related differences in cerebral capillary blood flow in anesthetized rats. *Neurobiology of aging*, *35*(8), 1947-1955.
- Di Tomaso, M. V., Vázquez Alberdi, L., Olsson, D., Cancela, S., Fernández, A., Rosillo, J. C., Reyes Ábalos, A. L., Álvarez Zabaleta, M., Calero, M., y Kun, A. (2022). Colocalization analysis of peripheral myelin protein-22 and lamin-B1 in the Schwann cell nuclei of Wt and TrJ mice. *Biomolecules*, *12*(3), 456.
- Dolan, R. J., Bench, C. J., Brown, R., Scott, L. C., Friston, K., y Frackowiak, R. (1992). Regional cerebral blood flow abnormalities in depressed patients with cognitive impairment. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *55*(9), 768-773.
- Dong, H. W. (2008). *The Allen reference atlas: A digital color brain atlas of the C57Bl/6J male mouse*. John Wiley & Sons Inc.

- Du Sert, N. P., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., et al. (2020). Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS biology*, *18*(7), e3000411.
- Erdem, A., Yac sargil, M. G., y Roth, P. (1993). Microsurgical anatomy of the hippocampal arteries. *Journal of neurosurgery*, *79*(2), 256-265.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D. A., y Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*, *4*(11), 1313-1317.
- Errico, C., Osmanski, B.-F., Pezet, S., Couture, O., Lenkei, Z., y Tanter, M. (2016). Transcranial functional ultrasound imaging of the brain using microbubble-enhanced ultrasensitive Doppler. *NeuroImage*, *124*, 752-761.
- Errico, C., Pierre, J., Pezet, S., Desailly, Y., Lenkei, Z., Couture, O., y Tanter, M. (2015). Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging. *Nature*, *527*(7579), 499-502.
- Erzurumlu, R. S., y Gaspar, P. (2012). Development and critical period plasticity of the barrel cortex. *European Journal of Neuroscience*, *35*(10), 1540-1553.
- Evans, D. H., Jensen, J. A., y Nielsen, M. B. (2011). Ultrasonic colour Doppler imaging. *Interface focus*, *1*(4), 490-502.
- Ferrier, J., Tiran, E., Deffieux, T., Tanter, M., y Lenkei, Z. (2020). Functional imaging evidence for task-induced deactivation and disconnection of a major default mode network hub in the mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(26), 15270-15280. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920475117>
- Girouard, H., y Iadecola, C. (2006). Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *Journal of applied physiology*, *100*(1), 328-335.
- Goldring, S., y Ratcheson, R. (1972). Human motor cortex: sensory input data from single neuron recordings. *Science*, *175*(4029), 1493-1495.
- Gozzi, A., y Schwarz, A. J. (2016). Large-scale functional connectivity networks in the rodent brain. *Neuroimage*, *127*, 496-509.
- Hearne, L. J., Mattingley, J. B., y Cocchi, L. (2016). Functional brain networks related to individual differences in human intelligence at rest. *Scientific reports*, *6*(1), 1-8.
- Hingot, V., Errico, C., Heiles, B., Rahal, L., Tanter, M., y Couture, O. (2019). Microvascular flow dictates the compromise between spatial resolution and acqui-

- sition time in Ultrasound Localization Microscopy. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Iadecola, C. (2017). The neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease. *Neuron*, 96(1), 17-42.
- Ivanov, K., Kalinina, M., y Levkovich, Y. I. (1981). Blood flow velocity in capillaries of brain and muscles and its physiological significance. *Microvascular research*, 22(2), 143-155.
- Ivashkina, O. I., Gruzdeva, A. M., Roshchina, M. A., Toropova, K. A., y Anokhin, K. V. (2019). Ex vivo and in vivo imaging of mouse parietal association cortex activity in episodes of cued fear memory formation and retrieval. *bioRxiv*, 863589.
- Kannurpatti, S. S., Biswal, B. B., Kim, Y. R., y Rosen, B. R. (2008). Spatio-temporal characteristics of low-frequency BOLD signal fluctuations in isoflurane-anesthetized rat brain. *Neuroimage*, 40(4), 1738-1747.
- Kasai, C., Namekawa, K., Koyano, A., y Omoto, R. (1985). Real-time two-dimensional blood flow imaging using an autocorrelation technique. *IEEE Transactions on sonics and ultrasonics*, 32(3), 458-464.
- Kinsler, L. E., Frey, A. R., Coppens, A. B., y Sanders, J. V. (2000). *Fundamentals of acoustics*. John wiley & sons.
- Kirschen, G. W., Kery, R., y Ge, S. (2018). The hippocampal neuro-glio-vascular network: metabolic vulnerability and potential neurogenic regeneration in disease. *Brain Plasticity*, 3(2), 129-144.
- Koekkoek, S., Tbalvandany, S. S., Generowicz, B., van Hoogstraten, W., De Oude, N., Boele, H., Strydis, C., Leus, G., Bosch, J., Van Der Steen, A., et al. (2018). High frequency functional ultrasound in mice. *2018 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)*, 1-4.
- Kun, A., Canclini, L., Rosso, G., Bresque, M., Romeo, C., Hanusz, A., Cal, K., Calliari, A., Sotelo Silveira, J., y Sotelo, J. R. (2012). F-actin distribution at nodes of Ranvier and Schmidt-Lanterman incisures in mammalian sciatic nerves. *Cytoskeleton*, 69(7), 486-495.
- Kun, A., Rosso, G., Canclini, L., Bresque, M., Romeo, C., Cal, K., Calliari, A., Hanuz, A., Roberto, J., y Roberto, J. (2012). The Schwann Cell-Axon Link in Normal Condition or Neuro-Degenerative Diseases: An Immunocytochemical Approach. *Applications of Immunocytochemistry; Dehghani, H., Ed.; InTech: London, Switzerland*, 249-266.

- Li, H.-C., Chen, P.-Y., Cheng, H.-F., Kuo, Y.-M., y Huang, C.-C. (2019). In vivo visualization of brain vasculature in Alzheimer's disease mice by high-frequency micro-doppler imaging. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 66(12), 3393-3401.
- Li, J., Parker, B., Martyn, C., Natarajan, C., y Guo, J. (2013). The PMP22 gene and its related diseases. *Molecular neurobiology*, 47(2), 673-698.
- Liddle, P., Friston, K., Frith, C., Hirsch, S., Jones, T., y Frackowiak, R. (1992). Patterns of cerebral blood flow in schizophrenia. *The British Journal of Psychiatry*, 160(2), 179-186.
- Lowerison, M. R., Sekaran, N. V. C., Zhang, W., Dong, Z., Chen, X., Llano, D. A., y Song, P. (2022). Aging-related cerebral microvascular changes visualized using ultrasound localization microscopy in the living mouse. *Scientific reports*, 12(1), 1-11.
- Mace, E., Montaldo, G., Cohen, I., Baulac, M., Fink, M., y Tanter, M. (2011). Functional ultrasound imaging of the brain. *Nature methods*, 8(8), 662-664.
- Mace, E., Montaldo, G., Osmanski, B.-F., Cohen, I., Fink, M., y Tanter, M. (2013). Functional ultrasound imaging of the brain: theory and basic principles. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 60(3), 492-506.
- Mandyam, C. D. (2013). The interplay between the hippocampus and amygdala in regulating aberrant hippocampal neurogenesis during protracted abstinence from alcohol dependence. *Frontiers in psychiatry*, 4, 61.
- Martini, R. (1997). Animal models for inherited peripheral neuropathies. *The Journal of Anatomy*, 191(3), 321-336.
- Mateus Goncalves, L., y Almaca, J. (2021). Functional characterization of the human islet microvasculature using living pancreas slices. *Frontiers in endocrinology*, 11, 602519.
- McKeown, M. J., y Sejnowski, T. J. (1998). Independent component analysis of fMRI data: examining the assumptions. *Human brain mapping*, 6(5-6), 368-372.
- Montaldo, G., Tanter, M., Bercoff, J., Benech, N., y Fink, M. (2009). Coherent plane-wave compounding for very high frame rate ultrasonography and transient elastography. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 56(3), 489-506.
- Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarrá, N., Ávila, J., y Llorens-Martin, M. (2019). Adult hip-

- pocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nature medicine*, 25(4), 554-560.
- Morrisset, C., Dizeux, A., Larrat, B., Selingue, E., Boutin, H., Picaud, S., Sahel, J.-A., Ialy-Radio, N., Pezet, S., Tanter, M., et al. (2022). Retinal functional ultrasound imaging (rfUS) for assessing neurovascular alterations: a pilot study on a rat model of dementia. *Scientific Reports*, 12(1), 19515.
- Nelson, T., y Pretorius, D. (1988). The Doppler signal: where does it come from and what does it mean? *American Journal of Roentgenology*, 151(3), 439-447.
- Nouhoum, M., Ferrier, J., Osmanski, B.-F., Ialy-Radio, N., Pezet, S., Tanter, M., y Deffieux, T. (2021). A functional ultrasound brain GPS for automatic vascular-based neuronavigation. *Scientific Reports*, 11(1), 1-12.
- Novak, V., y Hajjar, I. (2010). The relationship between blood pressure and cognitive function. *Nature Reviews Cardiology*, 7(12), 686-698.
- Nunez-Elizalde, A. O., Krumin, M., Reddy, C. B., Montaldo, G., Urban, A., Harris, K. D., y Carandini, M. (2022). Neural correlates of blood flow measured by ultrasound. *Neuron*, 110(10), 1631-1640.
- Obermeier, B., Daneman, R., y Ransohoff, R. M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature medicine*, 19(12), 1584-1596.
- Pareyson, D., y Marchesi, C. (2009). Diagnosis, natural history, and management of Charcot–Marie–Tooth disease. *The Lancet Neurology*, 8(7), 654-667.
- Pawley, J. (2006). *Handbook of biological confocal microscopy* (Vol. 236). Springer Science & Business Media.
- Paxinos, G., y Franklin, K. B. (2019). *Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic press.
- Pearce, J. (2007). Malpighi and the discovery of capillaries. *European neurology*, 58(4), 253-255.
- Perrone, L., Squillaro, T., Napolitano, F., Terracciano, C., Sampalo, S., y Melone, M. A. B. (2019). The autophagy signaling pathway: a potential multifunctional therapeutic target of curcumin in neurological and neuromuscular diseases. *Nutrients*, 11(8), 1881.
- Petersen, C. C. (2007). The functional organization of the barrel cortex. *Neuron*, 56(2), 339-355.

- Piechnik, S. K., Chiarelli, P. A., y Jezzard, P. (2008). Modelling vascular reactivity to investigate the basis of the relationship between cerebral blood volume and flow under CO<sub>2</sub> manipulation. *Neuroimage*, 39(1), 107-118.
- Pothuizen, H. H., Davies, M., Albasser, M. M., Aggleton, J. P., y Vann, S. D. (2009). Granular and dysgranular retrosplenial cortices provide qualitatively different contributions to spatial working memory: Evidence from immediate-early gene imaging in rats. *European Journal of Neuroscience*, 30(5), 877-888.
- Rabut, C., Correia, M., Finel, V., Pezet, S., Pernot, M., Deffieux, T., y Tanter, M. (2019). 4D functional ultrasound imaging of whole-brain activity in rodents. *Nature methods*, 16(10), 994-997.
- Rahal, L., Thibaut, M., Rivals, I., Claron, J., Lenkei, Z., Sitt, J. D., Tanter, M., y Pezet, S. (2020). Ultrafast ultrasound imaging pattern analysis reveals distinctive dynamic brain states and potent sub-network alterations in arthritic animals. *Scientific reports*, 10(1), 1-17.
- Reilly, M. M., Murphy, S. M., y Laura, M. (2011). Charcot-Marie-tooth disease. *Journal of the peripheral nervous system*, 16(1), 1-14.
- Renaudin, N., Demené, C., Dizeux, A., Ialy-Radio, N., Pezet, S., y Tanter, M. (2022). Functional ultrasound localization microscopy reveals brain-wide neurovascular activity on a microscopic scale. *Nature methods*, 19(8), 1004-1012.
- Robinson, J. L., Barron, D. S., Kirby, L. A., Bottenhorn, K. L., Hill, A. C., Murphy, J. E., Katz, J. S., Salibi, N., Eickhoff, S. B., y Fox, P. T. (2015). Neurofunctional topography of the human hippocampus. *Human brain mapping*, 36(12), 5018-5037.
- Rosso, G., Cal, K., Canclini, L., Damián, J. P., Ruiz, P., Rodriguez, H., Sotelo, J. R., Vazquez, C., y Kun, A. (2010). Early phenotypical diagnoses in Trembler-J mice model. *Journal of neuroscience methods*, 190(1), 14-19.
- Rubin, J. M., Adler, R. S., Fowlkes, J. B., Spratt, S., Pallister, J. E., Chen, J.-F., y Carson, P. L. (1995). Fractional moving blood volume: estimation with power Doppler US. *Radiology*, 197(1), 183-190.
- Rubin, J. M., Bude, R., Fowlkes, J., Spratt, R., Carson, P., y Adler, R. S. (1997). Normalizing fractional moving blood volume estimates with power Doppler US: defining a stable intravascular point with the cumulative power distribution function. *Radiology*, 205(3), 757-765.

- Rubin, J. M., Bude, R. O., Carson, P. L., Bree, R. L., y Adler, R. S. (1994). Power Doppler US: a potentially useful alternative to mean frequency-based color Doppler US. *Radiology*, *190*(3), 853-856.
- Rytkonen, J., Shatillo, A., Dudek, M., Puolivli, J., Oksman, J., Parkkari, T., Mischzuk, D., Yang, C., Braithwaite, S. P., y Minami, S. S. (2020). Functional ultrasound imaging can detect vascular changes in tau P301S mouse model of Alzheimer's disease: Neuroimaging/animal imaging. *Alzheimer's & Dementia*, *16*, e042487.
- Sahay, A., y Hen, R. (2007). Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature neuroscience*, *10*(9), 1110-1115.
- Scheinost, D., Sinha, R., Cross, S. N., Kwon, S. H., Sze, G., Constable, R. T., y Ment, L. R. (2017). Does prenatal stress alter the developing connectome? *Pediatric research*, *81*(1), 214-226.
- Schmidt-Kastner, R., y Freund, T. (1991). Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience*, *40*(3), 599-636.
- Shung, K. K. (2005). *Diagnostic ultrasound: Imaging and blood flow measurements*. CRC press.
- Shung, K. K., Sigelmann, R. A., y Reid, J. M. (1976). Scattering of ultrasound by blood. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, (6), 460-467.
- Soulioti, D. E., Espíndola, D., Dayton, P. A., y Pinton, G. F. (2019). Super-resolution imaging through the human skull. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, *67*(1), 25-36.
- Spallazzi, M., Dobisch, L., Becke, A., Berron, D., Stucht, D., Oeltze-Jafra, S., Caffarra, P., Speck, O., y Duzel, E. (2019). Hippocampal vascularization patterns: a high-resolution 7 Tesla time-of-flight magnetic resonance angiography study. *NeuroImage: Clinical*, *21*, 101609.
- Sterpetti, A. V. (2019). Cardiovascular research by Leonardo da Vinci (1452–1519). *Circulation research*, *124*(2), 189-191.
- Suter, U., Welcher, A. A., Ozcelik, T., Snipes, G. J., Kosaras, B., Francke, U., Billings-Gagliardi, S., Sidman, R. L., y Shooter, E. M. (1992). Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene. *Nature*, *356*(6366), 241-244.
- Szabo, T. L. (2004). *Diagnostic ultrasound imaging: inside out*. Academic press.
- Tanter, M., y Fink, M. (2014). Ultrafast imaging in biomedical ultrasound. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, *61*(1), 102-119.

- Tatu, L., y Vuillier, F. (2014). Structure and vascularization of the human hippocampus. *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*, 34, 18-25.
- Tiran, E., Ferrier, J., Deffieux, T., Gennisson, J.-L., Pezet, S., Lenkei, Z., y Tarter, M. (2017). Transcranial functional ultrasound imaging in freely moving awake mice and anesthetized young rats without contrast agent. *Ultrasound in medicine & biology*, 43(8), 1679-1689.
- Tsuji, S., Mukai, T., Hirano, H., y Morita, Y. (2021). In vivo analysis of thrombus formation in arthritic mice. *Modern Rheumatology*, 31(2), 498-503.
- Valentijn, L. J., Baas, F., Wolterman, R. A., Hoogendijk, J. E., van den Bosch, N. H., Zorn, I., Gabrels-Festen, A. A., de Visser, M., y Bolhuis, P. A. (1992). Identical point mutations of PMP-22 in Trembler-J mouse and Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nature genetics*, 2(4), 288-291.
- Vazquez Alberdi, L., Rosso, G., Veloz, L., Romeo, C., Farias, J., Di Tomaso, M. V., Calero, M., y Kun, A. (2022). Curcumin and Ethanol Effects in Trembler-J Schwann Cell Culture. *Biomolecules*, 12(4), 515.
- Wang, S., Hossack, J. A., y Klibanov, A. L. (2020). From anatomy to functional and molecular biomarker imaging and therapy: ultrasound is safe, ultrafast, portable, and inexpensive. *Investigative Radiology*, 55(9), 559-572.
- Wilson, M. A., Johnston, M. V., Goldstein, G. W., y Blue, M. E. (2000). Neonatal lead exposure impairs development of rodent barrel field cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10), 5540-5545.
- Young, J. (1929). Malpighi's "De pulmonibus."
- Yuan, Y., y Shung, K. K. (1988). Ultrasonic backscatter from flowing whole blood. I: Dependence on shear rate and hematocrit. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 84(1), 52-58.
- Zemla, R., y Basu, J. (2017). Hippocampal function in rodents. *Current opinion in neurobiology*, 43, 187-197.
- Zhao, F., Zhao, T., Zhou, L., Wu, Q., y Hu, X. (2008). BOLD study of stimulation-induced neural activity and resting-state connectivity in medetomidine-sedated rat. *Neuroimage*, 39(1), 248-260.
- Zlokovic, B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57(2), 178-201.

# **ANEXOS**

# Anexo 1

## Fundamento teórico de la descomposición en valores singulares de una matriz

Dada una matriz real  $A \in \mathbb{R}^{m \times n}$  los autovalores de la matriz  $A^T A \in \mathbb{R}^{n \times n}$  simétrica y definida semipositiva son siempre reales y mayores o iguales a cero.

Sean  $\lambda_1 \dots \lambda_n$  los autovalores de la matriz  $A^T A$  ordenados de mayor a menor, entonces  $\sigma_i = \sqrt{\lambda_i}$  es el  $i$ -ésimo valor singular de la matriz  $A$ .

Tomando los primeros  $r$  autovalores no nulos ordenados de forma decreciente y los siguientes  $n - r$  autovalores nulos, y sea  $\{v_1, \dots, v_n\}$  una base ortonormal de  $\mathbb{R}^n$  formada por autovectores de  $A^T A$ , entonces:

- $\{Av_1, \dots, Av_r\}$  es un conjunto ortonormal y su norma es  $\|Av_i\| = \sqrt{\lambda_i} = \sigma_i$ .
- $\{\frac{Av_1}{\sigma_1}, \dots, \frac{Av_r}{\sigma_r}\}$  es una base ortonormal del subespacio fundamental  $Col(A)$ .
- $\{v_{r+1}, \dots, v_n\}$  es una base ortonormal del subespacio fundamental  $Nul(A)$ .
- El rango de la matriz  $A$  coincide con la cantidad de valores singulares no nulos,  $rango(A) = r$ .

Para demostrar que se puede realizar la descomposición mencionada podemos tomar los autovalores de  $A^T A$  ordenados de manera  $\lambda_1 \geq \dots \lambda_r \geq \lambda_{r+1} = \dots = \lambda_n = 0$  y  $\{v_1, \dots, v_n\}$  es una base ortonormal formada por autovectores de  $A^T A$  cada uno asociado a un autovalor. El conjunto  $\{Av_1, \dots, Av_r\}$  es ortonormal con  $Av_{r+1} = \dots = Av_n = 0$ . Si llamamos  $u_1 = \frac{Av_1}{\sigma_1}, \dots, u_r = \frac{Av_r}{\sigma_r}$ , entonces:

- $\{u_1, \dots, u_r\}$  es un conjunto ortonormal, y si  $r < m$  podemos completar con  $\{u_{r+1}, \dots, u_m\}$  para formar una base ortonormal de  $\mathbb{R}^m$ .

- $$\left\{ \begin{array}{l} Av_1 = \sigma_1 u_1 \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ Av_r = \sigma_r u_r \\ Av_{r+1} = 0 \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ Av_n = 0 \end{array} \right.$$

Reescribiendo este último sistema de ecuaciones de manera matricial con  $V = [v_1, \dots, v_n] \in \mathbb{R}^{n \times n}$  y  $U\Sigma = [\sigma_1 u_1, \dots, \sigma_r u_r, 0, \dots, 0]$ . Por lo tanto tenemos que  $AV = U\Sigma$ , y como  $V$  es una matriz ortogonal entonces  $A = U\Sigma V^*$ . De esta forma la matriz  $A$  puede escribirse con la siguiente descomposición:

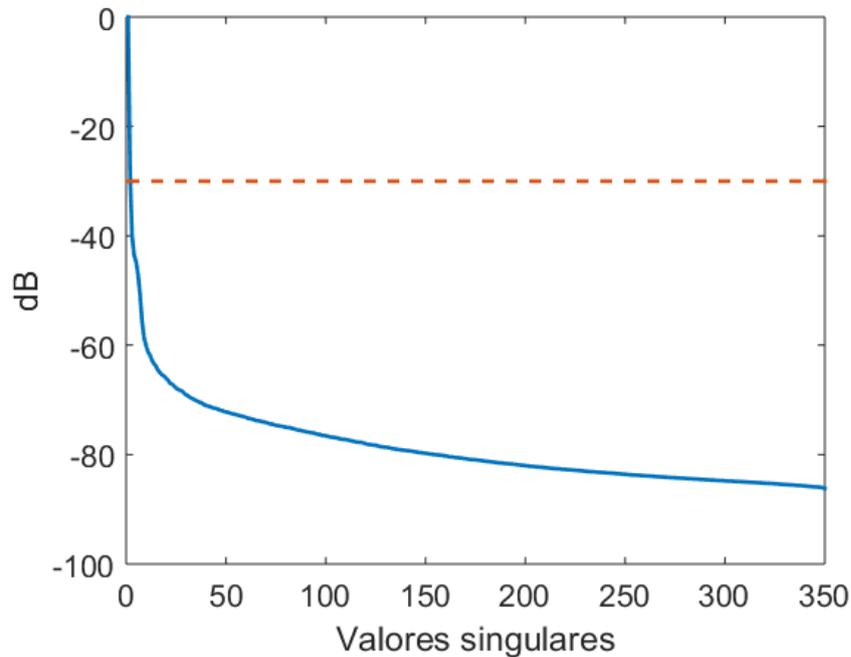
$$A = \sum_{i=1}^r \sigma_i u_i v_i^* \quad (1.1)$$

## 1.1. Otros estimadores para el filtro de imágenes por descomposición en valores singulares

### 1.1.1. Estimador basado en los valores singulares

Uno de los criterios básicos para seleccionar  $N$  es observar la distribución de valores singulares. Como los vectores propios están normalizados (es decir  $U_i^* \cdot U_i = 1 \quad \forall i$ , lo mismo para  $V$ ) entonces la energía de ese par de vectores está contenida en el valor singular  $\sigma_i$ .

En la figura 1.1 se observa la distribución de valores en decibeles. Los valores más bajos se asocian al movimiento del tejido conteniendo la mayor cantidad de energía. Un estimador posible es rechazar los valores singulares que se encuentren por encima de un determinado nivel de dB. Como se indica en la figura se puede seleccionar un valor de -30dB y quedarnos con los valores singulares que estén por debajo de dicha cota, eliminando así el movimiento del tejido de la imagen.

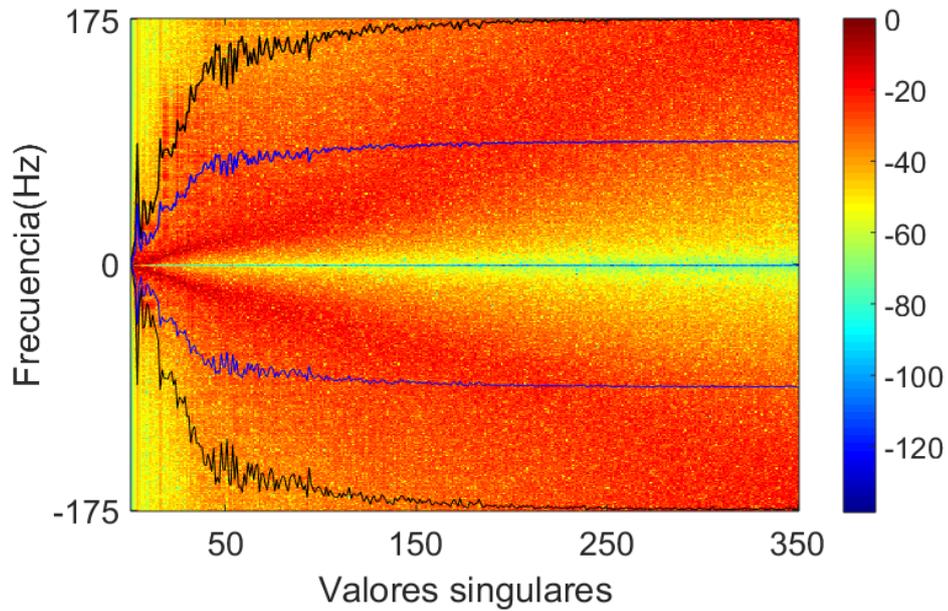


**Figura 1.1:** Distribución de valores singulares en función de su energía (línea azul). En línea punteada se grafica una referencia a -30dB, ejemplo de posible valor para aplicar cota al filtro.

### 1.1.2. Estimador basado en los vectores singulares temporales $V$

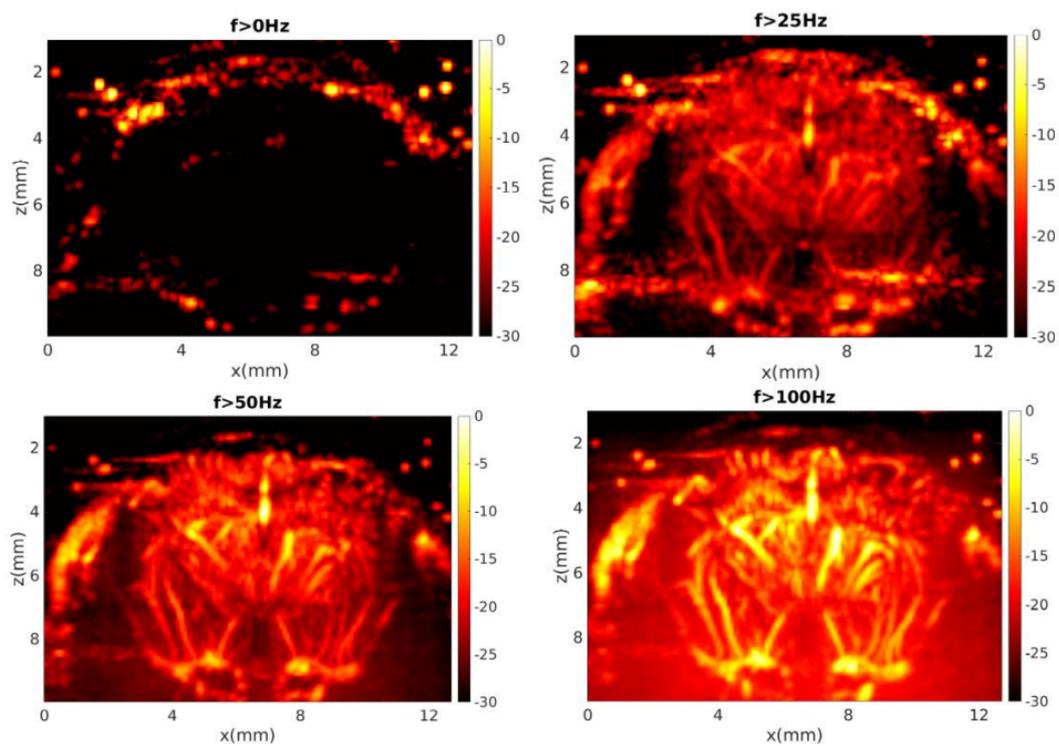
En el tratamiento de señales ultrasónicas el método más común a la hora de eliminar el movimiento del tejido, es pensar en realizar un filtro temporal pasa alto y rechazar las frecuencias bajas. Esto es debido a que el tejido y el flujo sanguíneo presentan frecuencias características distintas, y por lo tanto se esperaría que los vectores temporales sigan la misma tendencia. De esta forma nos podemos centrar en estudiar la densidad espectral de potencia de cada vector temporal (figura 1.2). Se calcula también el primer momento estadístico que corresponde a la frecuencia central (Baranger et al. 2018). Otra estadística interesante es que la señal de tejido tiene un ancho de banda más angosto que la señal de flujo, esto se puede observar calculando el comportamiento del ancho de banda que contiene un 99% de la energía.

De esta forma, un criterio de estimación que se puede utilizar es eliminar los valores singulares asociados a una frecuencia central y ancho de banda que se encuentren por debajo de determinada frecuencia. En la figura 1.3 se muestran las imágenes obtenidas luego de un filtro temporal a partir de las matrices  $V$  para distintos valores de corte de frecuencia. Como se observa para valores pequeños de la



**Figura 1.2:** Densidad espectral de potencia para los vectores temporales V. En azul se grafica la frecuencia central de cada vector propio temporal y en negro el ancho de banda, al 99 % de la energía, asociado a cada vector propio. La escala de colores representa decibeles.

frecuencia central solo tendremos asociados los valores singulares de mayor potencia. Por lo tanto para una frecuencia de corte baja los valores singulares asociados al movimiento de tejido estarán presentes en la imagen. En la figura 1.3 se puede observar como a medida que aumentamos la frecuencia de corte el flujo cerebral se hace más visible en la imagen ya que vamos eliminando los valores con más potencia asociados al tejido.



**Figura 1.3:** Comparación de las imágenes obtenidas para distintos valores de corte de la frecuencia central. En este caso se utilizan los valores singulares que se encuentran por encima de 0Hz, 25Hz, 50Hz y 100Hz. La escala de colores representa decibeles.

## Anexo 2

# Métodos estadísticos

En esta sección se describen de forma genérica algunos de los test estadísticos utilizados durante el trabajo. No se pretende hacer una descripción exhaustiva de los mismos sino un repaso de la idea general que permita entender los análisis expuestos en el manuscrito.

### 2.1. Test Shapiro-Wilk

Previo a realizar un test para comparar si existen diferencias entre dos distribuciones de datos debemos verificar cómo es el comportamiento de dichas distribuciones. Podemos separar esto en dos grandes categorías: conjuntos de datos que siguen una distribución normal o conjuntos de datos que no siguen una distribución normal.

Para el test de Shapiro-Wilk la hipótesis nula es que los datos están normalmente distribuidos. En este caso se calcula un estadístico  $W$  como:

$$W = \frac{(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (2.1)$$

siendo  $x_{(i)}$  el estadístico de orden  $i$ , esto es el  $i$ -ésimo valor más pequeños de la muestra,  $\bar{x}$  la media de la muestra, y los coeficientes  $a_i$  se calculan como

$$(a_1, \dots, a_n) = \frac{m^T V^{-1}}{(m^T V^{-1} V^{-1} m)^{1/2}}$$

donde  $m = (m_1, \dots, m_n)^T$  son los valores esperados del estadístico de orden de variables aleatorios independientes idénticas obtenidas de una distribución normal y  $V$  es la matriz de covarianza de dicho estadístico de orden.

Este valor  $W$  se puede asociar mediante una tabla, con dependencia de la cantidad de muestras del conjunto, a un p-valor para determinar si se rechaza o no la hipótesis nula. Si el p-valor es menor al valor de significancia establecido, que generalmente suele ser 0.05, entonces se rechaza la hipótesis nula y decimos que la distribución no es normal.

Existen otros diversos test para probar la normalidad de una muestra, como pueden ser los de Kolmogorov-Smirnov o Anderson-Darling, o incluso test cualitativos gráficos como los histogramas o gráficos Q-Q. En nuestro trabajo utilizamos en todos los casos Shapiro-Wilk para testear la normalidad.

## 2.2. Test t-Student

El test t-Student una prueba estadística utilizada para determinar si hay una diferencia significativa entre las medias de dos grupos diferentes. Es comúnmente utilizado cuando se trabaja con muestras pequeñas y se asume que las poblaciones tienen una distribución normal.

Existen dos tipos test t-Student: (1) **para muestras independientes**, que se utiliza cuando se comparan dos muestras independientes, es decir, dos grupos diferentes que no están relacionados entre sí. La hipótesis nula en este caso supone que las medias de ambos grupos son iguales, y la hipótesis alternativa sugiere que hay una diferencia significativa entre las medias de los grupos; y (2) **muestras pareadas**, que se utiliza cuando se comparan dos muestras que están relacionadas o emparejadas, como antes y después de un tratamiento en el mismo grupo, en este caso la hipótesis nula supone que la diferencia entre las mediciones es cero, mientras que la hipótesis alternativa sugiere que hay una diferencia significativa entre las mediciones. A lo largo de este trabajo utilizamos el test de muestras independientes ya que cada animal, y por lo tanto cada genotipo, es independiente de los demás.

El test calcula el valor  $t$ , que es una medida de la diferencia entre las medias de los grupos en términos de la variabilidad dentro de cada grupo. Esto puede expresarse, para muestras independientes, de la forma:

$$t = \frac{\hat{X}_1 - \hat{X}_2}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right) + \left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)}} \quad (2.2)$$

donde  $\hat{X}_1$  y  $\hat{X}_2$  son la media de las muestras,  $s_1$  y  $s_2$  las desviaciones estándar de cada muestra, y  $n_1$  y  $n_2$  los tamaños de las muestras. Luego considerando este

valor y los grados de libertad de la muestra (generalmente el tamaño de la misma) se puede obtener mediante una tabla de t-Student el **p-valor**, que corresponde a la probabilidad de que un dato esté alejado de la media una cantidad  $t$  de desviaciones estándar.

En función de este p-valor se rechazará o aceptará la hipótesis nula. Si el p-valor se encuentra por debajo del valor de significancia previamente establecido entonces se rechazará la hipótesis nula. Por ejemplo si nuestro valor de significancia establecido es 0.1 entonces un p-valor menor o igual a 0.05 indica que la diferencia entre las medias es estadísticamente significativa, lo que sugiere que las muestras no provienen de poblaciones con medias iguales.

### 2.3. Test Mann-Whitney

Cuando el conjunto de datos no sigue una distribución normal una alternativa usual para el test t-Student es el test de Mann-Whitney, o también conocido como prueba de suma de rangos de Wilcoxon. A este tipo de pruebas se le denomina *no paramétricas*, y en este caso busca determinar si existen diferencias entre dos grupos independientes en función de una variable ordinal (es decir que se puede ordenar). Ordenar la variable corresponde a definir los rangos, es decir numerar la variable de mayor a menor, considerando las entradas de ambos grupos. La hipótesis nula en este caso es que la suma de los rangos no difiere entre ambos grupos, y la hipótesis alternativa es que la suma de rangos difiere.

Para evaluar la validez de la hipótesis se calcula un estadístico  $U$  que se define como el mínimo valor de  $U_1$  y  $U_2$  siendo:

$$U_1 = n_1 * n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} + T_1 \quad (2.3)$$

$$U_2 = n_1 * n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} + T_2 \quad (2.4)$$

con  $n_1$  y  $n_2$  el tamaño de cada muestra, y  $T_1$  y  $T_2$  la suma de los rangos de cada muestra. Finalmente el estadístico  $U = \min(U_1, U_2)$  lo podemos asociar a un z-valor como:

$$z = \frac{U - \mu_U}{\sigma_U} \quad (2.5)$$

donde  $\mu_U$  y  $\sigma_U$  son el valor esperado y la desviación estándar respectivamente

de todo el conjunto.

El paso final es relacionar el z-valor con el p-valor mediante la tabla de referencia de estas dos variables. Luego, el p-valor se compara con el nivel de significancia, de la misma forma que se detalló para el test t-Student, para rechazar o aceptar la hipótesis nula.

## 2.4. Test ANOVA

El test ANOVA, por sus siglas en ingles Analysis of Variance, corresponde a un conjunto de procedimientos estadísticos para evaluar si existen diferencias significativas en las distribuciones de 3 o más grupos. Lo podemos pensar como una extensión del test t-Student para más de dos conjuntos de datos. En este caso la hipótesis nula es que la media de todos los conjuntos no difieren, mientras que la hipótesis alternativa es que las medias de al menos dos conjuntos difieren. En el caso más simple, correspondiente a considerar un efecto único sobre los distintos grupos, el estadístico que se utiliza para validar o no la hipótesis es:

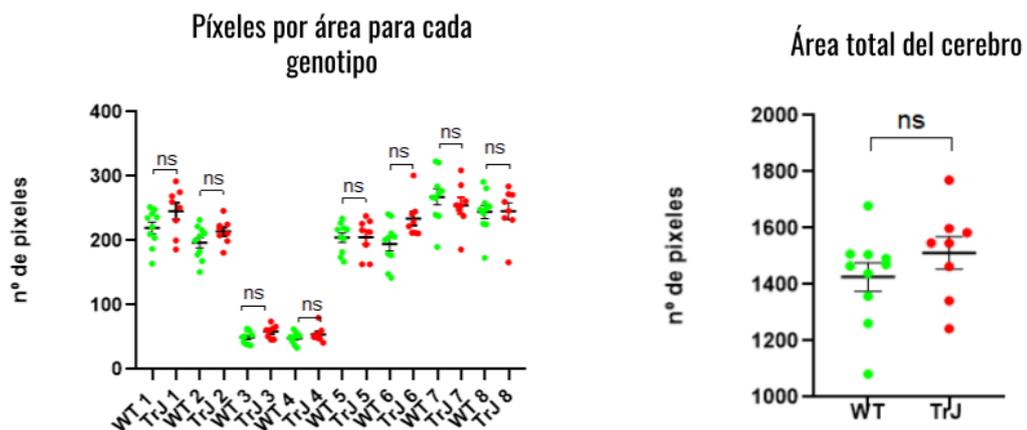
$$F = \frac{MSB}{MSW} \quad (2.6)$$

donde  $MSB = \frac{SSB}{dfB}$  siendo  $SSB$  la medida de la variabilidad entre grupos a partir de la suma cuadrática de las desviaciones y  $dfB$  el número de grupos menos uno (grados de libertad asociado a los grupos), y por otro lado  $MSW = \frac{SSW}{dfW}$  siendo  $SSW$  la variabilidad dentro de cada grupo, también medida a partir de la suma cuadrática de las desviaciones, y  $dfW$  el número total de observaciones del conjunto menos uno (grados de libertad asociados a la población total). Por lo tanto, este estadístico es una relación entre la variabilidad intra e inter grupal. Luego este estadístico se compara con una tabla para evaluar el grado de significancia en las diferencias al igual que los test anteriores.

## Anexo 3

# Resultados adicionales del ultrasonido funcional

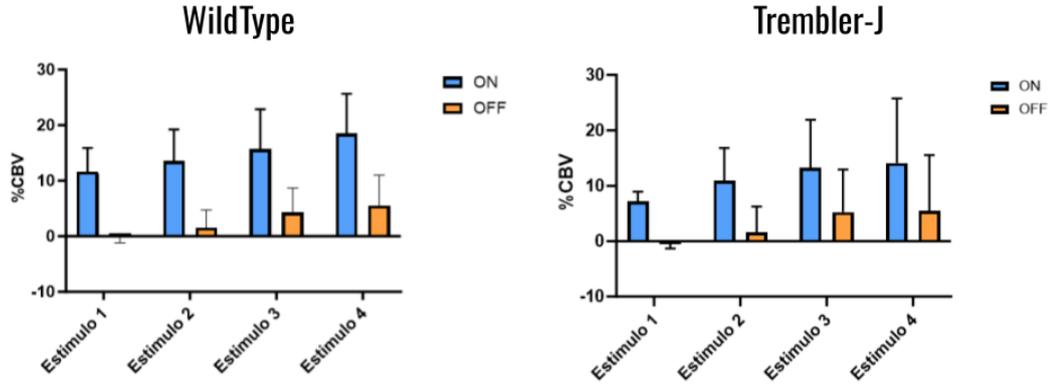
En la figura 3.1 se muestran la cantidad de píxeles en cada región del cerebro delimitada según la imagen 5.5 (capítulo 5) para cada genotipo. Como se puede observar, en ninguna de las regiones el área presentó diferencias significativas entre genotipos, lo cual indica que la máscara que delimita las regiones no es un factor incidente en los análisis posteriores. En segundo lugar, se muestra el área total en cantidad de píxeles para cada genotipo. Nuevamente no hay diferencias significativas entre ambas.



**Figura 3.1:** Para cada genotipo se muestra la cantidad de píxeles en cada región del cerebro (numeradas según la imagen 5.5 en el capítulo 5). Se observa que en ningún caso hay diferencias significativas entre el valor medio de píxeles por región comparando entre genotipos. Para el área total del cerebro, calculada en cantidad de píxeles, tampoco se observan diferencias significativas entre genotipos.

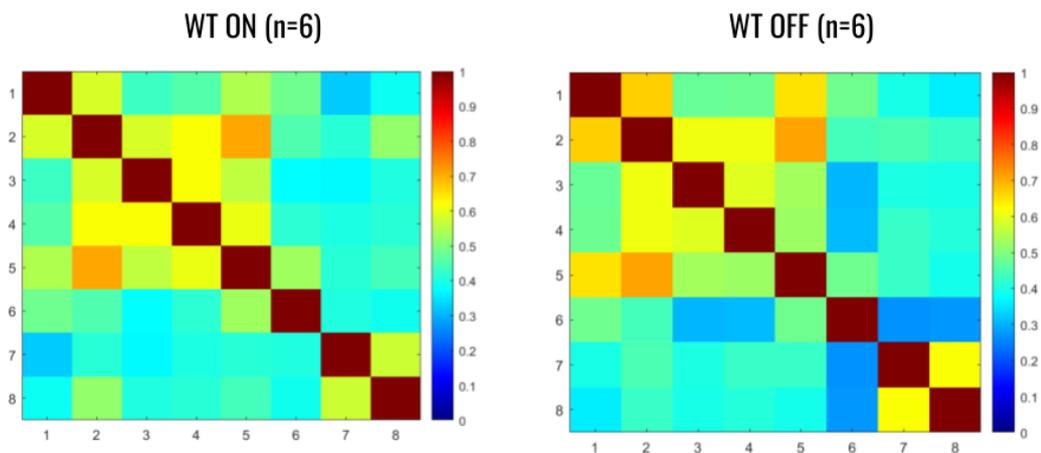
En la figura 3.2 se muestra la evolución a medida que se aplican nuevos estímulo-

los, de la amplitud de la señal Doppler para cada genotipo.



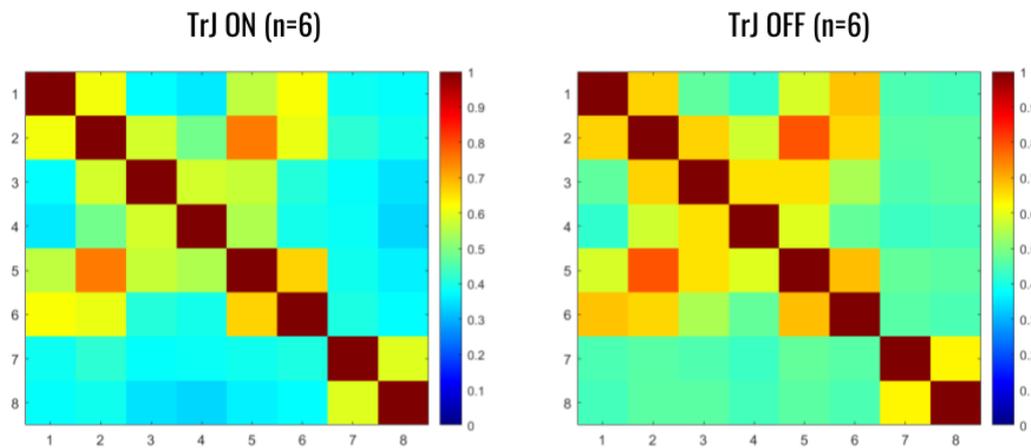
**Figura 3.2:** Para cada genotipo se muestra los valores de  $CBV_{ON}$  y  $CBV_{OFF}$  definidos según la figura 5.4.

En la figura 3.3 se muestran las matrices de correlación entre regiones construidas de forma análoga al procedimiento descrito en Ferrier et al. 2020 para el genotipo WT. En este caso la matriz **WT ON** se obtiene a partir de correlacionar las señales de cada región concatenando los intervalos temporales en que se está aplicando el estímulo. La matriz **WT OFF** corresponde a las señales formadas a partir de la concatenación de los periodos donde no se está aplicando el estímulo. Los datos utilizados son los que provienen del experimento fUS definido en el capítulo 5. En este caso no se utilizan los datos de RS.



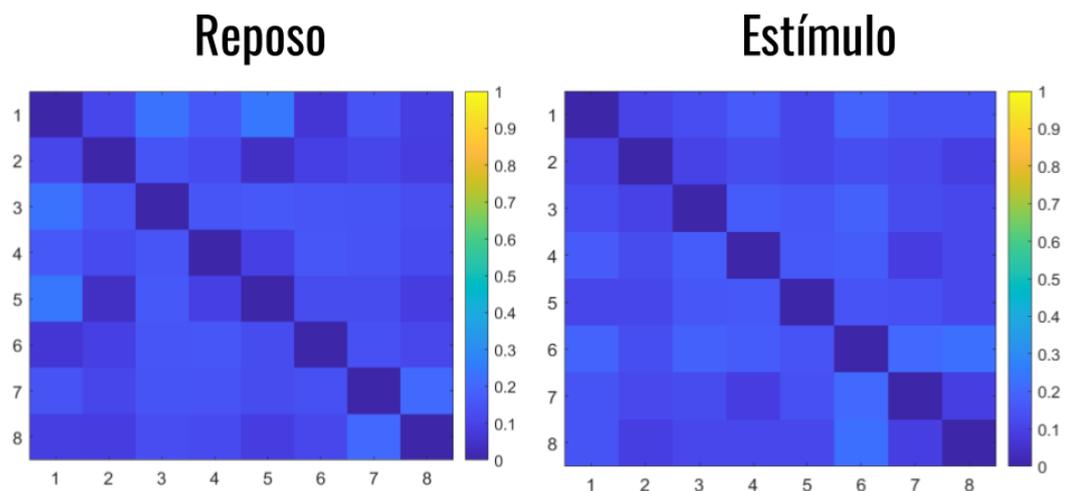
**Figura 3.3:** Matrices de correlación entre regiones del cerebro para el genotipo WT, construidas a partir de concatenar los periodos donde se está estimulando (ON) y los periodos donde no se está estimulando (OFF). Se sigue la misma metodología descrita en el trabajo de Ferrier et al. 2020.

De forma análoga a lo anterior se muestran las matrices para el genotipo TrJ en la figura 3.4.



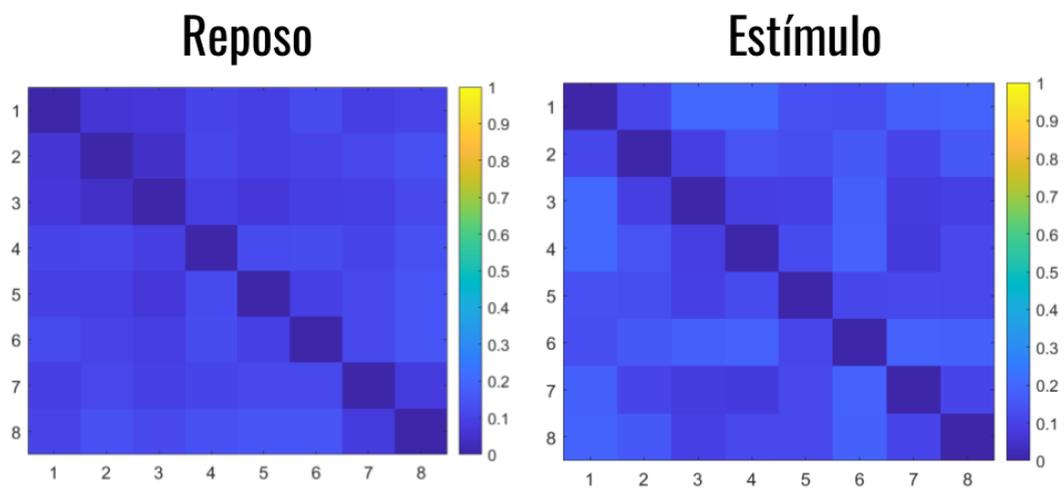
**Figura 3.4:** Matrices de correlación entre regiones del cerebro para el genotipo TrJ, construidas a partir de concatenar los periodos donde se está estimulando (ON) y los periodos donde no se está estimulando (OFF). Se sigue la misma metodología descrita en el trabajo de Ferrier et al. 2020.

En la figura 3.5 se muestra la desviación estándar para cada entrada de las matrices de correlación de los estados fUS y RS (figura 5.9 en el capítulo 5) para el genotipo WT.



**Figura 3.5:** Matrices de desviación estándar para el genotipo WT, correspondiente a las matrices mostradas en la figura 5.9, con n=6 para Reposo y n=6 para Estímulo.

De forma análoga a lo anterior se muestran las matrices de desviación estándar para los dos estados en el genotipo TrJ en la figura 3.6.



**Figura 3.6:** Matrices de desviación estándar para el genotipo TrJ, correspondiente a las matrices mostradas en la figura 5.10, con  $n=5$  para Reposo y  $n=6$  para Estímulo.

## Anexo 4

# Publicaciones y presentaciones en congresos derivados de la tesis

A partir de este trabajo de tesis surgió la siguiente publicación en revistas arbitradas:

- **Anzibar Fialho, M<sup>+</sup>**, Vázquez Alberdi, L<sup>+</sup>, Martínez, M<sup>+</sup>, Calero, M., Baranger, J., Tanter, M., Damián, J.P., Negreira, C., Rubido, N., Kun, A. & Brum, J. (2022). “Intensity distribution segmentation in ultrafast Doppler combined with scanning laser confocal microscopy for assessing vascular changes associated with ageing in murine hippocampi”. *Scientific Reports*, 12(1), 6784. (+ estos autores contribuyeron de forma equitativa).

También se realizaron las siguientes presentaciones de trabajos en congresos nacionales e internacionales (presentados por \*):

- IEEE Internatioal Ultrasonic Symposium 2023. “Functional Ultrasound in the Brain of TrJ mice, a Model of the Neurodegenerative Disease of Charcot Marie Tooth”. **Anzibar Fialho, M.**, Vázquez Alberdi, L., Martínez, M., Calero, M., Baranger, J., Tanter, M., Damián, J.P., Negreira, C., Rubido, N., Kun, A. & Brum, J. (aceptado).
- IEEE International Ultrasonic Symposium 2022. “Vascular changes due to ageing using Ultrafast Ultrasound Doppler combined with Scanning Laser Confocal Microscopy”. **Anzibar Fialho, M.**, Vázquez Alberdi, L., Martínez, M., Calero, M., Baranger, J., Tanter, M., Damián, J.P., Negreira, C., Rubido, N., Kun, A. & Brum, J\*.

- Functional Ultrasound Imaging of the Brain 2022, Corcega, Francia. “Implementation of functional ultrasound setup for mice brain study in Montevideo, Uruguay”. **Anzibar Fialho, M\***, Vázquez Alberdi, L., Martínez, M., Baranger, J., Tanter, M., Damián, J.P., Negreira, C., Rubido, N., Kun, A. & Brum, J.
- Functional Ultrasound Imaging of the Brain 2022, Corcega, Francia. “Ultrafast Doppler and correlative scanning laser confocal microscopy to characterize neuropathologies in the vascular system of the mouse brain”. Martínez, Vázquez, **Anzibar Fialho, M\***, Vázquez Alberdi, L., Martínez, M., Calero, M., Baranger, J., Tanter, M., Damián, J.P., Negreira, C.\*, Rubido, N., Kun, A. & Brum, J.
- XXI Conference of Nonequilibrium Statistical Mechanics and Nonlinear Physics 2022. “Studying neurodegenerative diseases using functional ultrasound”. **Anzibar Fialho, M\***, Vázquez Alberdi, L., Martínez, M., Baranger, J., Tanter, M., Damián, J.P., Negreira, C., Rubido, N., Kun, A. & Brum, J.
- XVII Reunión de la Sociedad Uruguaya de Física 2022. “Ultrasonido funcional para el estudio de enfermedades neurodegenerativas”. **Anzibar Fialho, M\***, Vázquez Alberdi, L., Martínez, M., Baranger, J., Tanter, M., Damián, J.P., Negreira, C., Rubido, N., Kun, A. & Brum, J.
- III Congreso Nacional de Biociencias 2022. “Ultrasonido funcional para el estudio de la actividad vascular cerebral en ratones de genotipo TrJ y WT”. **Anzibar Fialho, M\***, Vázquez Alberdi, L., Martínez, M., Baranger, J., Tanter, M., Damián, J.P., Negreira, C., Rubido, N., Kun, A. & Brum, J.
- IEEE Latin America Ultrasonic Symposium 2021. “Ultrafast ultrasound Doppler and confocal microscopy correlative approach: blood flow and vascular structure in adult wild type mice”. **Anzibar Fialho, M\***, Vázquez Alberdi, L., Martínez, M., Calero, M., Baranger, J., Tanter, M., Damián, J.P., Negreira, C., Rubido, N., Kun, A. & Brum, J.
- IEEE International Ultrasonic Symposium 2021. “Relationship between blood flow and vascular structure at hippocampal level is revealed by correlating ultrafast ultrasound Doppler and confocal microscopy”. **Anzibar Fialho, M\***, Vázquez Alberdi, L., Martínez, M., Calero, M., Baranger, J., Tanter, M., Damián, J.P., Negreira, C., Rubido, N., Kun, A. & Brum, J.

Finalmente se obtuvo el siguiente premio internacional durante el desarrollo de esta tesis:

- IEEE Latin America Ultrasonic Symposium 2021: Best Student Paper Award Winner for the paper entitled “Ultrafast ultrasound Doppler and confocal microscopy correlative approach: blood flow and vascular structure in adult wild type mice” to **Maximiliano Anzibar Fialho**.